

Potential und praktische Anwendung der MALDI-TOF Technologie für die Analyse von Bakteriengemeinschaften

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Jun Yang

aus Hubei / China

1. Referent: Privatdozent Dr. Joachim M. Wink
2. Referent: Professor Dr. Jörg Overmann
eingereicht am: 26.09.2012
mündliche Prüfung (Disputation) am: 16.01.2013

Druckjahr 2013

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Yang, J., Lorenz, W., Pötter, G., Spröer, C., von Jan, M., Kroppenstedt, R. M. & Klenk, H. P. *Streptomyces muralis* sp. nov., a novel species of *Streptomyces* isolated from an indoor Wall. International Journal of Systematic and evolutionary Microbiology (eingereicht).

Ali, Z., Cousin, S., Frühling, A., Brambilla, E., Schumann, P., Yang, J*. & Stackebrandt, E. Description of *Flavobacterium rivuli* sp. nov., *Flavobacterium subsaxonicum* sp. nov., *Flavobacterium swingsii* sp. nov. and *Flavobacterium reichenbachii* sp. nov., isolated from a hard water rivulet. International Journal of Systematic and evolutionary Microbiology 59: 2610–2617 (2009).

*Y war druckfehler im Paper.

Cousin, S., Brambilla, E., Yang, J. & Stackebrandt, E. Culturable aerobic bacteria from the upstream region of a karst water rivulet. International Microbiol 11: 91–100 (2008).

In Liebe und Dankbarkeit meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungen	VII
Zusammenfassung	IX
1 Einleitung	1
1.1 Polyphasische Taxonomische Charakterisierung	2
1.2 Methoden zur Beschreibung der mikrobiellen Gemeinschaften	5
1.2.1 Kultivierungsabhängige Methoden	6
1.2.2 Kultivierungsunabhängige Methoden	7
1.2.2.1 Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH)	8
1.2.2.2 Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE)	9
1.2.3 MALDI-TOF Massenspektrometrie	10
1.2.3.1 Das Prinzip des MALDI-TOF Massenspektrometers	10
1.2.3.2 MALDI TOF/TOF Massenspektrometrie	14
1.2.3.3 MALDI-TOF Massenspektrometrie zur Identifizierung	14
1.3 Natürliche Bakteriengemeinschaften	16
1.3.1 Der Westerhöfer Bach	16
1.3.2 Baumaterialien und Innenräume mit Feuchteschäden	17
1.4 Zielsetzung der Arbeit	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Nährmedien	20
2.1.2 Puffer	25
2.1.3 Chemikalien	27
2.1.4 Bakterienstämme	28
2.1.5 Kits	28
2.1.6 Geräte	28
2.2 Wasserprobe	31
2.2.1 Probenahme und Kultivierung der Isolate	31
2.2.2 Wasserprobenahme und Vorbereitung	31
2.3 Anzucht und Kultivierung der für Datenbank verwendeten Referenzstämme	32
2.3.1 Kultivierung der <i>Flavobacterium</i>	32
2.3.2 Kultivierung der <i>Actinomyceten</i>	32
2.4 Isolierungen der Ribosomen	32
2.4.1 Kultivierung der Bakterien	32
2.4.2 Ribosomenisolierung	33
2.5 Untersuchungen der Mischungen	34

2.5.1	Proteinbestimmung	35
2.5.2	Qualitative und quantitative Analysen der Mischung von Ribosomen	35
2.5.3	Herstellung der Mischungen isolierter Ribosomen	35
2.5.4	Zellextrakte und Ribosomen der 6-Organismen Mischkultur	36
2.6	Ansequenzierung der Peaks.....	36
2.6.1	<i>E. coli</i> Wachstum in verschiedenen Medien.....	36
2.6.2	Protein Sequenzierung mit MALDI TOF/TOF MS	37
2.7	Labormischungen (Blindversuch)	38
2.8	Innenraumprobennahme und Vorbereitung.....	39
2.8.1	Probenahme	39
2.8.2	Probenvorbereitung mittels Stomacher.....	39
2.9	Untersuchungen der Bakterien in Innenraum.....	40
2.9.1	MALDI Analyse der Innenraumproben.....	40
2.9.2	Kultivierungsabhängige Analysen.....	40
2.9.2.1	Kultivierung der Baumaterialproben.....	40
2.9.2.2	Isolierungen.....	41
2.9.2.3	Identifizierung der Bakterien	41
2.9.2.3.1	Morphologischen Charakterisierung.....	41
2.9.2.3.2	Fettsäuren	42
2.9.2.3.3	Bestimmen der Diaminopimelinsäure (DAP)	43
2.9.2.3.4	MALDI Identifizierung.....	44
2.9.2.4	Konservierung in Glycerinmedium (LGA).....	44
2.9.3	Molekularbiologische Analyse	44
2.9.3.1	DNA Extraktion	44
2.9.3.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	46
2.9.3.3	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE).....	48
2.9.3.4	Sequenzierung	50
2.10	MALDI-TOF Massenspektrometrie Analytik.....	51
2.10.1	Präparation der Matrix	52
2.10.2	Vorbereitung der Bakterien	52
2.10.2.1	Probenpräparation	52
2.10.2.2	Extraktion des Bakteriums	53
2.10.2.3	Vorbereitung der ganzen Zellen.....	53
2.10.2.4	Vorbereitung der Ribosomen	53
2.10.3	Präparation auf dem Target	53
2.10.4	Messungen	54
2.10.5	Verarbeitung mit FlexAnalysis.....	55
2.10.6	BioTyper Datenbank und Identifizierung	55
3	Ergebnisse.....	60
3.1	Direkte Analyse der Wasserprobe aus dem Westerhöfer Bach.....	60

3.2	Phylogenetische Relevanz von MALDI-TOF Spektren für die Gattung: <i>Flavobacterium</i>	61
3.3	Differenzierungen der Mischkultur	66
3.3.1	Vergleich von <i>Escherichia coli</i> Extrakten	66
3.3.2	Qualitative und quantitative Untersuchungen	70
3.3.3	Verschiedene Versuchsansätze	72
3.3.3.1	Mischungen der Ribosomen bis zu sechs verschiedenen Bakterien	73
3.3.3.2	Die 6-Organismen-Mischkultur	80
3.4	Einfluss von Medien und Wachstumszeit	82
3.5	Charakterisierung des Laborgemisches (Blindversuche)	86
3.6	Analyse von Bakterien in Baumaterialien mit Feuchteschäden	92
3.6.1	Erstellung der MALDI-Datenbank für <i>Aktinomyceten</i>	92
3.6.2	Direkte MALDI Analyse für Materialproben	93
3.6.3	Kultivierungsabhängige Untersuchungen.....	93
3.6.3.1	Morphologische Charakterisierung.....	95
3.6.3.2	Chemotaxnomische Identifizierung	96
3.6.3.3	MALDI Ergebnisse von Isolatn	99
3.6.3.4	16S Sequenzierung.....	99
3.6.4	DGGE (Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese)	102
4	Diskussion.....	104
4.1	Erfolgreiche Differenzierung der Mischkulturen	104
4.2	Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaften mit dem MALDI-BioTyper System	105
4.3	Vorteile	108
4.3.1	Schnelligkeit und einfache Probenvorbereitung.....	108
4.3.2	Geringere Kosten	109
4.3.3	Reproduzierbarkeit	109
4.4	Vergleich der Auflösungsvermögen von MALDI-TOF und anderen Methoden	110
4.4.1	Vergleich von MALDI-TOF, morphologischen, chemotaxnomischen und molekularbiologischen Identifizierung der Isolate	110
4.4.2	Vergleich der MALDI-BioTyper System mit Isolierung und DGGE	111
4.5	Einsatzgebiete.....	113
4.6	Ausblick.....	115
5	Literaturverzeichnis	117
6	Anhang.....	142
7	Danksagung.....	156

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Taxonomische Auflösung einiger momentan verwendeter Methoden in der Taxonomie von Bakterien	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der MALDI-Ionisierung	11
Abbildung 3: Häufig verwendete Matrizen für MALDI.....	12
Abbildung 4: Schematische Darstellung der MALDI-TOF Massenspektrometrie.....	14
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Untersuchungsabläufe	19
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Isolierung der Ribosomen	34
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Mischungen isolierter Ribosomen.....	36
Abbildung 8: Proben target zur MALDI-Messung	54
Abbildung 9: Ein „main spektrum“ eines ausgewählten Stamms.....	56
Abbildung 10: Vergleich der Peaks	57
Abbildung 11: Spektren von <i>Flavobacterium</i> -Typstämmen	62
Abbildung 12: Dendrogramm von MALDI und 16S rRNA-Gensequenzen.....	63
Abbildung 13: Dendrogramm der „main spectra“ von <i>Flavobacterium</i>	65
Abbildung 14: Vergleich der Spektren von Extraktion und Ribosomen	67
Abbildung 15: MS-Spektren von Ribosomen und drei Mischungen	70
Abbildung 16: MS-Spektrum von Mischung der Ribosomen aus zwei Bakterien	73
Abbildung 17: MS-Spektrum von Mischung der Ribosomen aus drei Mikroorganismen.....	74
Abbildung 18: Das Spektrum von Mischung der Ribosomen aus vier Mikroorganismen	75
Abbildung 19: Das Spektrum von Mischung der Ribosomen aus fünf Bakterien	77
Abbildung 20: Das Spektrum von Mischung der Ribosomen aus sechs Bakterien	78
Abbildung 21: Das Spektrum der gesamten Ribosome aus sechs-Bakterien Mischung.....	80
Abbildung 22: Das Spektrum der sechs-Bakterien Mischung	82
Abbildung 23: Wachstum des <i>E. coli</i> Stamms in LB- und R2A Flüssigmedien	83
Abbildung 24: Einfluss von verschiedenen Zeiten und Nährmedien auf Zellextrakt	84
Abbildung 25: MALDI TOF/TOF Spektren von zwei untersuchten Peaks	85
Abbildung 26: Identifizierung verschiedener Bakterien in einer Mischung der klinischen Proben.....	88
Abbildung 27: Identifizierung verschiedener Bakterien in einer Mischung der Milchprodukte	90
Abbildung 28: Zellen der Bacillus-Isolate mit Endosporen	95
Abbildung 29: Elektronenmikroskopische Aufnahme von drei Isolaten	96

Abbildung 30: Chromatogramm der Fettsäurezusammensetzung von Isolaten jy312-9 durch Gaschromatographie.....	97
Abbildung 31: Liste der gefundenen Fettsäuren von Isolate jy312-9	98
Abbildung 32: DGGE der bakteriellen Gemeinschaften von Baumaterialproben	102

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In der Arbeit verwendete Geräte.....	28
Tabelle 2: Zusammensetzung der Reaktionsansätze (Mastermix) für die PCR-Reaktion	46
Tabelle 3: Ablauf der PCR für DGGE.....	47
Tabelle 4: Zusammensetzung der Lösung für DGGE	49
Tabelle 5: Zusammenfassung des Sequenzieransatzes.....	50
Tabelle 6: Bedingungen der PCR-Reaktion während der Sequenzierung.....	51
Tabelle 7: Verschiedene Parameter der Ergebnisse der Identifizierung	58
Tabelle 8: Der Report der Identifizierungsergebnisse von <i>Bacillus cereus</i> -Isolaten.....	59
Tabelle 9: Vergleich der Peakmassen in Sequenzdaten und Experimentdaten (Peaks in den Spektren von <i>E. coli</i> Extrakt und isolierten Ribosomen)	67
Tabelle 10: Vergleich des Mischungsverhältnisses und MALDI Peaksintensitäten	72
Tabelle 11: Peaklist der Ribosomen Mischung aus sechs Bakterien.....	78
Tabelle 12: Überblick über die Anzahlen der Peaks in Mischkulturen	81
Tabelle 13: Liste der MALDI TOF/TOF Daten	86
Tabelle 14: BioTyper Ergebnisse von der Mischkultur der klinischen Proben	87
Tabelle 15: BioTyper Ergebnisse von der Mischkultur der Milchprodukte	89
Tabelle 16: BioTyper Ergebnisse von der Mischkultur der fleischverderbenden Organismen	91
Tabelle 17: BioTyper Ergebnisse von der Mischkultur der bierverderbenden Organismen	92
Tabelle 18: MALDI-BioTyper Ergebnisse für Materialproben.....	93
Tabelle 19: Zugehörigkeit der gewonnenen Isolate zur Phyla/Klasse und Gattungen.....	94
Tabelle 20: Identifizierung der Isolate.....	100
Tabelle 21: Vergleich der DGGE-Sequenzen mit den Einträgen der NCBI-Datenbank	103
Tabelle 22: Vergleich von MALDI / DGGE / Isolate.....	107

Abkürzungen

°C	Celsius
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ANI	average nucleotide identity
AP-PCR	arbitrarily primed PCR
ARDRA	Amplifizierte rRNA Gen Restriktionsanalyse
bzgl.	bezüglich
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
d. h.	das heißt
Da	Dalton
DAP	Diaminopimelinsäure
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DDH	DNA-DNA-Hybridisierung
dest.	destilliert
DGGE	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese
DHB	2,5-Dihydroxy-Benzoesäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM	Deutsche Sammlung Mikroorganismen Nummer
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
FAB	Fast Atom Bombardement
FAME	fatty acid methylesters
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
G	Guanin
g	Gram
GBDP	genome BLAST distance phylogenies
GFP	grün fluoreszierende Protein
H ₂ O	Wasser
HCCA	α-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure
HPLC	High Performance/Pressure Liquid Chromatography = Hochdruckflüssigkeitschromatographie
L	Liter
LC	Liquid Chromatography (hier: LC=HPLC)
LFRFA	Low frequency restriction fragment analysis
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MALDI	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionization

mg	Milligramm
ml	Milliliter
MLSA	Multilocus Sequenz Analyse
MS	Massenspektrometrie
p.a.	pro analysis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	pulsed-field gel electrophoresis
ppm	parts per million = Teile pro Million
RAPD	randomly amplified polymorphic DNA
REM	Raster-Elektronen-Mikroskopie
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
SARAMIS	Spectral Archive and Microbial Identification System
SELDI	Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation
sp.	Spezies
SSCP	Single-Strand-Conformation-Polymorphismus
ssp.	Supspezies
Tab.	Tabelle
TGGE	Temperature Gradient Gel Electrophoresis
TOF	Time-of-Flight = Flugzeit
TRFLP	Terminale Restriktionsfragmentlängen-polymorphismus
u. U.	unter Umständen
UPM	Umdrehungen pro Minute
usw.	und so weiter
z. B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionization Flugzeit Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) zur Analyse der Mischkulturen sogar bei natürlichen bakteriellen Gemeinschaften eingesetzt werden kann.

Im Rahmen der Analyse von Wasserproben wurde eine Identifizierungsdatenbank von *Flavobacterium* aufgebaut, die 40 *Flavobacterium*-Typstämme beinhaltet. Damit wurden 52 Isolate aus Wasserproben des Westerhöfer Baches als *Flavobacterium*-Spezies identifiziert. Ein Vergleich mit 16S rRNA Sequenzen aus denselben Proben ergab vergleichbare Ergebnisse.

In einem zweiten experimentellen Ansatz wurde das Potential von MALDI-TOF MS bei der Analyse von Mischkulturen *in vitro* untersucht. Es wurden 9 Mischungen von Ribosomen oder Zellextrakten mittels MALDI-TOF MS qualitativ erfolgreich differenziert. Im Ergebnis wurde deutlich, dass die Überlagerung von Signalen aus ribosomalen Proteinen bei mehreren Bakterien der Haupteinflussfaktor für die Analyse von Mischungen mittels MALDI-TOF MS ist. Außerdem wurden die Signale eines Stressproteins in einer Zellmischung mittels MALDI TOF/TOF MS identifiziert. Des weiteren konnte der Einsatz von MALDI-TOF & BioTyper Analyse auf künstliche mikrobielle Gemeinschaften bestimmt werden.

Im letzten Teil der Arbeit wurden die natürlichen Bakteriengemeinschaften direkt mit dem MALDI-TOF & BioTyper System untersucht. Dafür wurde eine Identifizierungsdatenbank für Actinomyceten aufgebaut, die Signalmuster von 142 *Actinobacterium*-Stämmen enthält. Parallel wurden diese Umweltproben mit kultivierungsabhängigen und -unabhängigen Methoden klassifiziert. Durch einen Vergleich der Ergebnisse aller Methoden ließen sich die Einsatzmöglichkeiten des vorgestellten MALDI-TOF & BioTyper Systems evaluieren. Für die schnelle Identifizierung der bakteriellen Gemeinschaften stellt MALDI-TOF MS ein effizientes Werkzeug dar. Darüber hinaus ist die MALDI-Methode, im Vergleich zu 16S rRNA-basierten Ansätzen, schnell, einfach und preisgünstig.

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die MALDI-TOF MS das Potential hat, natürliche Bakteriengemeinschaften zu charakterisieren. Diese Methode ist eine sinnvolle Ergänzung zu kultivierungsabhängigen und molekularbiologischen Methoden.

1 Einleitung

Mikroorganismen kommen ubiquitär in allen terrestrischen und aquatischen Lebensräumen vor. Aufgrund ihrer Verbreitung, ihrer großen Diversität und ihrer außerordentlichen physiologischen Fähigkeiten spielen Mikroorganismen in vielen Bereichen eine entscheidende Rolle. Als erster Schritt zum Verständnis der Funktionen der Mikroorganismen ist die bakterielle Identifizierung eine der Zentralaufgaben der Mikrobiologie.

Pathogene Mikroorganismen oder deren Toxine kommen als Kontaminationen in Lebensmitteln vor, oder infizieren als Boden- oder Luftkeime den Menschen. Derartige Ereignisse können auch im großen Maßstab eintreten. Ein Beispiel ist die Epidemie im Mai bis Juli 2011 in Norddeutschland, bei der insgesamt 3.842 Personen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) des Serotyps O104:H4 infiziert wurden (Robert Koch-Institut, 2011). Weiterhin haben sich nosokomiale Infektionen in den letzten zwei Jahrzehnten zu einem immer größer werdenden Problem entwickelt. Darunter versteht man bakterielle Infektionen, die im Zusammenhang mit dem Krankenhausaufenthalt oder einer Pflegeeinrichtung auftreten. Die Gesamtzahl der nosokomialen Infektionen in Europa wird von dem Europäischen Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten auf etwa drei Millionen pro Jahr taxiert (Amato-Gauci & Ammon, 2007). Trotz vieler taxonomischer Methoden gibt es bei oben genannten aktuellen Problemen immer einen Bedarf, die Mikroorganismen in der Umwelt schnell und zuverlässig zu identifizieren. In vielen Bereichen wie z. B. der medizinischen Diagnostik, Biodefense, dem Umweltmonitoring und der Lebensmittelindustrie ist es sinnvoll, neue Technologien für eine schnelle, sichere und kostengünstige Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaften zu entwickeln (Hain *et al.*, 1997; Demirev & Fenselau, 2008).

Die auf der Erkennung von Proteinmustern basierende MALDI-TOF MS ist eine relativ neue Methode in der taxonomischen Charakterisierung. Jedes Bakterium hat ein eigenes Proteinprofil, welches sich in individuellen Massenspektren widerspiegelt. Mit den erzeugten spezifischen MS-Spektren kann man entsprechend Bakterien (Stackebrandt *et al.*, 2005), Hefen (Sherburn & Jenkins, 2003) und Pilze (Valentine *et al.*, 2002) identifizieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Potentiale und die praktische Anwendung der MALDI-TOF Technologie zur Analyse bakterieller Gemeinschaften erforscht werden. Zuerst wurde die Einsatzmöglichkeit der MALDI-TOF Massenspektrometrie für die Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaften *in vitro* untersucht, in dem die Anwendungsbereiche und Einflussfaktoren der Methode ermittelt wurden. Anschließend wurde die MALDI-Technik für

die direkte Analyse von Umweltproben eingesetzt und mit kultivierungsabhängigen und -unabhängigen Methoden verglichen.

1.1 Polyphasische Taxonomische Charakterisierung

Die Taxonomie von Mikroorganismen beruht auf der Klassifizierung, Nomenklatur und Identifizierung von Isolaten. Klassifizierung bedeutet systematische Einordnung von Organismen in verwandte Gruppen, die ähnliche Eigenschaften besitzen. Die Nomenklatur dient der Benennung der Mikroorganismen nach internationalen wissenschaftlichen Regeln, die im „International Code of Nomenclature of Bacteria“ veröffentlicht sind (Sneath, 1992). Bei der Identifizierung von Isolaten werden unbekannte Organismen basierend auf ihren jeweiligen Ähnlichkeiten und Merkmalen den bestehenden taxonomischen Gruppen zugeordnet.

Traditionelle Grundlage der Klassifizierung ist die Feststellung von phänotypischen Merkmalen, also morphologischen und physiologischen Eigenschaften (Van Niel, 1944). Danach ist die Chemotaxonomie zu einem Standardverfahren bei der Beschreibung einer Art entwickelt worden (Guckert *et al.*, 1991; Kohring *et al.*, 1994). In den letzten Jahren wurden die molekularbiologischen Methoden verstärkt angewandt, um die phylogenetischen Beziehungen zu ermitteln (Banner *et al.*, 2005; Stackebrandt, 1992). Durch die Analysen von 16S rRNA Gensequenzen kann die evolutionäre Beziehung verschiedener Mikroorganismen mittels mathematischer Methoden aufgeklärt werden. Heutzutage spielt die polyphasische Taxonomie eine wichtige Rolle (Wink, 2002). Dieser Begriff wurde von Colwell (1970) erstmals beschrieben um bakterielle Arten anhand von morphologischen, physiologischen, chemotaxonomischen und genotypischen Merkmalen zu charakterisieren. Die häufigsten verwendeten Methoden sind in Abbildung 1 mit ihrem unterschiedlichen Auflösungsvermögen dargestellt.

Die **morphologische Charakterisierung** ist die älteste Methode für die Klassifizierung (Pridham *et al.*, 1958). Unter standardisierten Kulturbedingungen (Shirling & Gottlieb, 1966 – nur *Streptomyces*) werden die Bakterien nach den Eigenschaften der jeweiligen Kolonie wie Farbe, Form, Größe und Konsistenz differenziert. Um die Zellen der Mikroorganismen und ihre Feinstruktur zu untersuchen, wird die Lichtmikroskopie und Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM) benutzt. Bei Prokaryoten kann man verschiedene zelluläre Merkmale wie Zellformen, Farbe, Größe, Mobilität, Struktur auf der Zelloberfläche, Differenzierung des

Mycels, Form der Sporenkette usw. beobachten. Bis heute ermöglicht diese Charakterisierung noch bei unbekannten Isolaten eine erste phänotypische Einteilung.

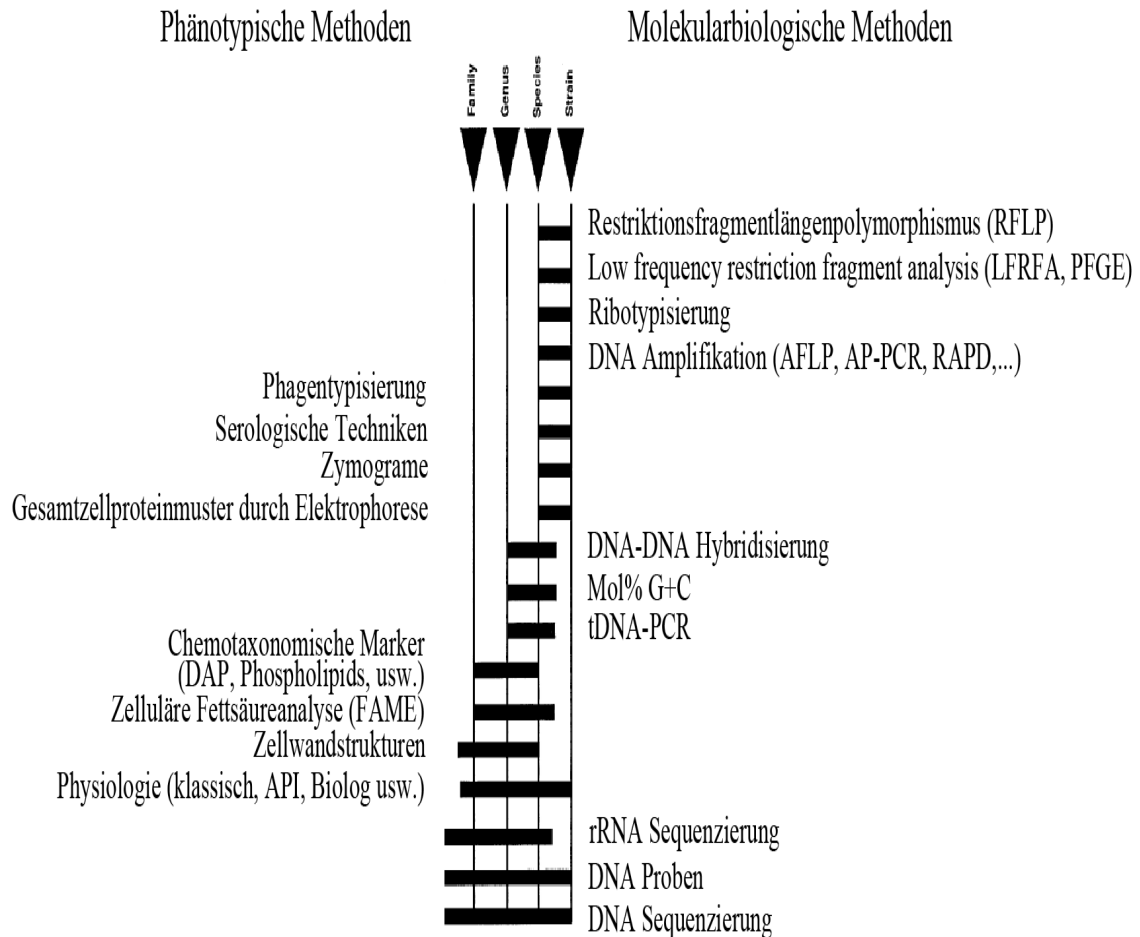


Abbildung 1: Taxonomische Auflösung einiger momentan verwendeter Methoden in der Taxonomie von Bakterien

Abkürzungen: RFLP, restriction fragment length polymorphism; LFRFA, Low frequency restriction fragment analysis; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; AFLP, amplified fragment length polymorphism; AP-PCR, arbitrarily primed PCR; RAPD, randomly amplified polymorphic DNA; DAP, Diaminopimelinsäure; FAME, fatty acid methylesters (Vandamme *et al.*, 1996).

Die **physiologische Klassifizierung** beruht auf den Stoffwechselleistungen von Mikroorganismen. Dazu wird das Wachstum bei unterschiedlichen Temperaturen, pH-Werten und atmosphärischen Bedingungen, die Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen (Zucker, Citrat, Lactat) sowie die Aktivität verschiedener Enzyme beurteilt.

Die **Chemotaxonomie** gehört zu einer der wichtigen Methoden bei der Taxonomie (Stackebrandt *et al.*, 1997). Dabei werden Zellwandbestandteile wie Diaminopimelinsäuren,

Mycolsäuren, Zellwandzucker, Fettsäuren und Menachinone durch chromatographische Trennung analysiert (Kroppenstedt, 1979).

Die Struktur des Peptidoglycans spielt bei der Gattungsdiagnose von Gram-positiven Bakterien eine große Rolle (Lechevalier & Lechevalier, 1970; Hancock, 1994). Während Gram-negative Bakterien meso-Diaminopimelinsäure (meso-DAP) in Position drei des Tetrapeptids haben, besitzen Gram-positive Arten L-Lysin, meso- oder LL-Diaminopimelinsäure. Besonders für die Charakterisierung der Actinomyceten wird die DAP-Bestimmung immer durchgeführt. Die gesamte DAP der Zellwand kann mit Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden.

Die Fettsäurenanalyse ist eine genaue, gut automatisierte und schnelle Methode zur Identifizierung (Abel *et al.*, 1962, Tighe *et al.*, 2000). Die zellulären Fettsäuren, die als Bestandteil der Glykolipide und Phospholipide in der Zellmembran vorkommen, bestehen aus einer Kohlenstoffkette von 9 bis 20 Atomen. Sie unterscheiden sich in der Kettenlänge, An- oder Abwesenheit von ungesättigten Gruppen, zyklischen oder verzweigten Ketten und den Hydroxygruppen; sie sind wegen ihrer Vielfältigkeit für taxonomischen Klassifizierung geeignet (Vandamme *et al.*, 1996).

Zur Analyse von Fettsäuren werden die entsprechend aufbereiteten Fettsäuremethylester in der Gaschromatographie getrennt. Das Muster der Fettsäuremethylester (FAME) wird mittels einer Datenbank (z. B. Midi-Datenbank) ausgewertet. Jeder Stamm hat ein eigenes spezifisches Fettsäuremuster, das meist artspezifisch ist (Kates, 1964). In vielen Fällen hat die Fettsäureanalytik übereinstimmende Ergebnisse mit den 16S rRNA Daten gezeigt und wird in der klinischen Analytik sowie in der ökologischen Forschung angewendet.

Die **molekularbiologische Identifizierung** ermöglichte eine dramatische Entwicklung der prokaryotischen Taxonomie, die auf phylogenetischer Ebene begründet wird (Pace, 1997; Hugenholtz *et al.*, 1998).

Heutzutage ist die Verwendung von Markergenen eines der großen Potentiale für die phylogenetische Charakterisierung von Bakterien (Woese & Fox, 1977). Dabei werden die Analysen von ribosomalen RNA-Sequenzen, die aus 5S-, 16S- und 23S rRNA Genen bestehen, als Werkzeug zur taxonomischen Identifizierung benutzt. Diese Markermoleküle sind in allen Bakterien als wichtige Komponenten der Proteinbiosynthese vorhanden und enthalten sowohl stark konservierte als auch variable Regionen (Woese, 1987). In den variablen Bereichen treten unterschiedliche Sequenzänderungen auf, die charakteristisch für eine Art, Familie oder sogar Ordnung sind. Je größer die Sequenzunterschiede sind, desto

geringer ist die phylogenetische Verwandtschaft zweier Bakterien. Daher eignen sich diese rRNA-Sequenzen besonders gut für eine taxonomische Charakterisierung der bekannten Bakterienarten sowie die Einordnung neuer Arten.

Es ist immer ein wichtiges aber auch problematisches Thema, wie ähnlich ein neue Art oder Gattung mit anderen bekannten Bakterien ist. Zuerst wird die 16S rRNA-Analyse für die Identifizierung unbekannter Isolate durchgeführt. Dabei wird ein Isolat, dessen 16S rRNA-Sequenz weniger als 98,5% von der aller anderen Organismen identisch ist, als neue Art definiert (Stackebrandt & Ebers, 2006). Bei Sequenzähnlichkeiten über 98,5% ist eine DNA-DNA-Hybridisierung notwendig, um die Einzigartigkeit eines Isolates zu sichern. Diese Methode wurde seit den 60iger Jahren für den Vergleich von Genomen eingesetzt (Rossello-Mora & Amann, 2001). Allgemein gilt eine DNA-Hybridisierung von über 70% als Indiz dafür, dass die beiden betrachteten Stämme zur gleichen Art gehören. Obwohl die beiden Techniken als Goldstandard angesehen werden, sind sie zur Differenzierung nahe verwandter Stämmen nicht ausreichend. Als Alternativen zur DNA-DNA-Hybridisierung wurde die Gesamtgenomsequenzierung und der Vergleich der Sequenzen eines Genompaares entwickelt (Konstantinidis & Tiedje, 2005). Aus einer durchschnittlichen Nukleotidentität (%c) der gemeinsamen Gene ergibt sich der evolutionäre Abstand zwischen Stämmen. Die Artgrenze liegt bei 94% ANI. Noch eine andere Methode ist GBDP (genome BLAST distance phylogenies), die verschiedenen Standardverfahren kombiniert, um einen phylogenetischen Baum aus einer gegebenen Menge der Gesamt-Genome zu erzeugen (Henz *et al.*, 2005). In neuester Zeit kann die DNA-DNA-Hybridisierung *in silico* mit GBDP berechnet werden, und die abgeleitete Genom-zu-Genom Distanzen zeigen dabei eine bessere Korrelation mit 16S rRNA-Genesequenz Entfernungen als die DDH Werte (Auch *et al.*, 2010). Eine weitere Technik ist die Multilocus Sequenz Analyse (MLSA). Dabei werden verschiedene wichtige Gene des Primärstoffwechsels sequenziert. Sie sind generell konserviert, liefern aber eine höhere Auflösung der evolutionären Distanzen zwischen nah verwandten Bakterien als 16S rRNA-Gene (Winkelmann *et al.*, 2010).

1.2 Methoden zur Beschreibung der mikrobiellen Gemeinschaften

In der Natur leben die Mikroorganismen meistens in Form mikrobieller Gemeinschaften. Um einen besseren Einblick in die Struktur und Funktionen mikrobieller Gemeinschaften in einem bestimmten Umwelthabitat zu gewinnen, müssen zunächst die Abundanz und Diversität der Mikroorganismen ermittelt werden. Dabei wurden zwei unterschiedliche Ansätze entwickelt:

zum einem die kultivierungsabhängigen und zum anderen die kultivierungsunabhängigen Methoden.

1.2.1 Kultivierungsabhängige Methoden

Die klassischen kultivierungsabhängigen Methoden beruhen auf Kultivierung und Isolierung der Mikroorganismen (Van Elsas *et al.*, 1998). Dabei werden verschiedene Kulturmedien verwendet, die geeignete Probe ausplattiert, unter entsprechenden Bedingungen bebrütet und zur Quantifizierung von Mikroorganismen die Kolonien ausgezählt. Danach werden die erhaltenen Kolonien zu Reihenkulturen herangezogen und die isolierten Bakterien aufgrund der morphologischen und physiologischen Eigenschaften klassifiziert.

Für den Kultivierungserfolg spielt die Zusammensetzung der Kulturmedien, Ausstattung der Enzyme und Lebenszustand der jeweiligen Bakterien eine entscheidende Rolle. In dem DSMZ Katalog stehen mehr als 400 verschiedenen Medien für routinemäßige Kultivierung der vielfältigen Bakterienstämme zu Verfügung. Davon sind einige Medien nur für die Kultivierung von ganz spezifischen Bakterientypen wie den Extremophilen geeignet, während die anderen zur Anzüchtung zahlreicher Bakterienstämme verwendet werden. Mit den unselektiven Medien werden die schnell wachsenden Mikroorganismen häufig isoliert. Deshalb benutzt man für die Analyse der Umweltproben eine serielle Verdünnung um die langsam wachsenden Bakterien zu vereinzeln.

Bei diesen Untersuchungen besteht ein Problem darin, dass die Anzahl der im Labor kultivierten Bakterienarten deutlich geringer ist als die Vielzahl der Arten von Mikroorganismen *in situ*. Die Methoden können nur auf weniger als 1% der natürlich vorkommenden Bakterien angewendet werden, die gegenwärtig unter Laborbedingungen anwachsen (Amann *et al.*, 1995; Holben & Harris, 1995; Pickup, 1991). In der Domäne *Bacteria* sind nur 30 von 100 Phyla bisher bekannt, die kultivierbare Organismen aufweisen (Pace, 2009).

Die „Unkultivierbarkeit“ hängt von zwei Faktoren ab: Entweder sind die Zellen nicht in der Lage sich zu vermehren, oder können die natürlichen Lebensbedingungen der Bakterien im Labor nicht nachgebildet werden.

Um ein aussagefähiges Ergebnis zu bekommen, werden die Untersuchungen mehrere Tage lang durchgeführt. Deshalb sind diese Methoden für eine schnelle Diagnose nicht geeignet.

1.2.2 Kultivierungsunabhängige Methoden

Zellfärbemethoden stellen Möglichkeiten dar, Mikroorganismen aus Umweltproben quantitativ zu untersuchen. Nach den Färbungen werden verschiedene Informationen über die bakteriellen Gemeinschaften unter Anwendung der Mikroskopie geliefert. Die DAPI-Färbung (4',6-Diamidin-2-phenylindol) kann die Zellanzahl in einem bestimmten Habitat ermitteln (Zarda *et al.*, 1997). Mit fluoreszierenden Antikörpern wird ein bestimmtes Bakterium in natürlichen oder klinischen Proben identifiziert. Um die Zellen in Ökosystemen zu verfolgen, wird das grün fluoreszierende Protein (GFP) als ein Mittel eingesetzt. Außerdem können durch manche Färbemethoden lebenden und tote Zellen differenziert werden (Auschill *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2006).

Mikroorganismen können stark unterschiedliche Größe haben und weisen meist nur kaum unterscheidbare morphologische Merkmale auf. In den natürlichen Proben sind einige Bakterien aufgrund ihrer Größe unter dem Mikroskop leicht zu übersehen. Noch eine Limitierung für diese Methode ist die fehlende Differenzierbarkeit der Zellen in den Gemeinschaften, welche morphologisch ähnlich aber genetisch völlig anders sein können.

Molekularbiologische Techniken wurden in den letzten zwanzig Jahren für die kulturunabhängige Analyse mikrobieller Gemeinschaften in Umweltproben entwickelt (Olsen *et al.*, 1986).

Mit der Entwicklung der PCR (polymerase chain reaction) durch Saiki *et al.* (1988) wurde die Amplifikation ausgesuchter Gene oder Genfragmente aus einem DNA Gemisch ermöglicht. Die großen Fortschritte der Molekularbiologie erleichterten die kulturunabhängige Identifikation von Prokaryoten zusätzlich.

Die konservierten Regionen der 16S rRNA Gene werden mittels spezieller Primer amplifiziert, die komplementär zu den Zielbereichen der DNA-Abschnitte sind. Die so von diversen Spezies erhaltenen DNA-Fragmente können für die Generierung von Klonbibliotheken verwendet werden. Die Kombination der Erstellung von Genbanken und anderen Fingerprinttechniken ermöglichen eine Erfassung der bakteriellen Diversität und Zusammensetzung eines Umwelthabitats.

Zur Identifizierung und Quantifizierung der in der Natur vorkommenden Mikroorganismen wird die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH; Amann *et al.*, 1990) mit spezifischen Oligonukleotidsonden eingesetzt. Zahlreiche andere Methoden wurden zur Beschreibung der mikrobiellen Gemeinschaften entwickelt, die meist auf der Ebene des 16S rRNA-Gens mittels PCR-Methoden angewendet wurden (Heuer & Smalla, 1997; Dahllöf, 2002). Das Verfahren

der PCR ermöglicht eine Vermehrung von spezifischen, zuvor ausgewählten DNA Fragmenten, damit die Menge der untersuchten Ausgangsmoleküle ausreichend ist. Danach werden PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese und Sequenzierung identifiziert. Zu solchen Methoden zählen die Amplifizierte rRNA Gen Restriktionsanalyse (ARDRA) (Massol-Deya *et al.*, 1995), die Analyse von amplifizierten Sequenzabschnitten durch Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE; Muyzer *et al.*, 1993; Heuer *et al.*, 1997; Muyzer & Smalla, 1998), Temperatur Gradienten Gelelektrophorese (TGGE; Rosenbaum & Riesner, 1987; Nübel *et al.*, 1996), der Single-Strand-Conformation-Polymorphismus (SSCP) (Lee *et al.*, 1996; Schmalenberger & Tebbe, 2002) und der Terminale Restriktionsfragmentlängen-polymorphismus (TRFLP) (Liu *et al.*, 1997; Osborn *et al.*, 2000; Blackwood *et al.*, 2003). Im Folgenden werden zwei Methoden im Detail beschrieben: Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung und Denaturing Gradient Gel Electrophoresis.

1.2.2.1 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Diese Technik ermöglicht eine direkte Untersuchung der Zellen in mikrobiellen Gemeinschaften, bei der phylogenetische Bakteriengruppen mit fluoreszenzmarkierten RNA- oder DNA-Sonden nachgewiesen werden. Diese Methode wurde erstmals von Pardue & Gall (1969) sowie John *et al.* (1969) unabhängig voneinander beschrieben.

Die Sonden sind einzelsträngige DNA-Fragmente, die homolog zu Sequenzen in den Zielgenen sind und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Als Zielgene kommen 16S ribosomale RNA-Gene, funktionelle Gene oder sogar spezifische mRNA in Frage. Diese Methode beruht auf der Hybridisierung, d. h. der Neigung einzelsträngiger DNA und RNA sich mit komplementären Partnern zu verbinden. Bei der FISH erfolgt dieser Schritt im biologischen Präparat anstatt an isolierten DNA-Molekülen, bei denen das Zielgen noch in den Zellen vorliegt.

Durch die Hybridisierung der Sonden werden die Zellen bei Fluoreszenzanregung im Mikroskop sichtbar gemacht. Damit kann ein Organismus oder eine Gruppe verwandter Organismen spezifisch in einer Probe identifiziert und quantifiziert werden (DeLong *et al.*, 1989, Amann *et al.*, 1990). Der Einsatz einer Vielzahl von Sonden mit verschiedenfarbigen Markierungen ermöglicht die phylogenetische Charakterisierung mehrerer im Habitat vorkommender Bakterienarten.

Ein Vorteil der FISH-Methode ist, dass die Zusammensetzung mikrobieller Populationen in einer Probe direkt bestimmt und Veränderung im Detail beobachtet werden können. Allerdings ist die Sensitivität dieser Methode von der Zahl der Ribosomen abhängig (Amann

et al., 1995). Neben der Umweltmikrobiologie wird die FISH-Technik auch in medizinischer Mikrobiologie und der Lebensmittelindustrie verwendet.

1.2.2.2 Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE)

Mikrobielle Gemeinschaften können auch mittels DGGE durch die Auftrennung sequenzspezifischer DNA-Fragmenten – die gleiche Längen aber unterschiedlicher Sequenzen besitzen – untersucht werden (Muyzer *et al.*, 1993).

Mit einem chemischen Gradienten aus einer Mischung von Harnstoff und Formamid werden die DNA-Moleküle, die zuvor in einer PCR amplifiziert wurden, in einem Polyacrylamid-Gel entsprechend ihres Schmelzeigenschaften aufgetrennt. Eine Guanin- und Cytosin-reiche Sequenz wird schwerer aufgespalten als eine Sequenz mit hohem Anteil an Thymin und Adenin. Deswegen sind die gewonnenen DGGE-Banden vom Unterschied in der Basensequenz abhängig. Die Banden unterschiedlicher Proben, die in einem DGGE-Gel an gleichen Positionen beobachtet werden, sind in ihren Sequenzen identisch und stammen daher vom gleichen Organismus.

Zur Identifizierung der Mikroorganismen werden die individuellen Banden ausgeschnitten und sequenziert. Die dabei erhaltenen Sequenzen können in DNA-Datenbanken hinterlegt und mit den vorhandenen Sequenzen bisher bekannter Organismen verglichen werden. Durch die Analyse der DGGE-Bandenmuster kann die Diversität der Mikroorganismen in einer Umweltprobe bestimmt werden (Röhlke *et al.*, 1996).

Zunächst wurde DGGE für die Entdeckung der Punktmutationen im medizinischen Bereich angewendet (Myers *et al.*, 1985; Sheffield *et al.*, 1989). 1993 verwendeten Muyzer *et al.* die Methode erstmals in der Untersuchung von mikrobiellen Gemeinschaften. Danach wurde PCR-DGGE-Analytik immer häufiger zur Analyse der mikrobiellen Diversität in verschiedenen mikrobiellen Ökosystemen eingesetzt, z. B. Böden (Heuer *et al.*, 1997; Smalla *et al.*, 2001), dem menschlichen und tierischen Gastrointestinaltrakt (Simpson *et al.*, 1999), Pflanzenwurzeln, Ozeane und Süßwasserseen.

Die DGGE-Methode hat den Vorteil, dass eine große Anzahl von Proben auf schnellem Wege sowohl gleichzeitig analysiert als auch verglichen werden kann. Nicht nur die Unterschiede zwischen verschiedenen mikrobiellen Gemeinschaften, sondern auch die Änderungen innerhalb eines Habitats werden mit der DGGE-Technik ermittelt.

Mittels dieser Methode können bis zu 500 Basenpaare eines DNA-Fragments analysiert werden. Normalerweise enthält ein Spektrum 10-20 Banden und mit den in den Banden enthaltenen DNA Fragmenten werden die dominanten Bakterien in den mikrobiellen

Gemeinschaften identifiziert. Mittels PCR-DGGE können die Mikroorganismen mit einem Anteil von mehr als 1% an der Gesamtgemeinschaft erfasst werden (Muyzer *et al.*, 1996). Allerdings fallen die Ergebnisse für gleich Proben in verschiedenen Labors unterschiedlich aus (Sigler *et al.*, 2004).

1.2.3 MALDI-TOF Massenspektrometrie

In jüngster Zeit wird die Erstellung des Proteinmusters mittels Massenspektrometrie als eine neue Methode eingesetzt, um Bakterien aus verschiedenen Probenmaterialien schnell und zuverlässig zu klassifizieren. Dabei werden organismusspezifische Proteinmuster identifiziert, die mit Referenzspektren aus einer zugrundeliegenden Datenbank verglichen werden.

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine Analysetechnik, in der gasförmige Ionen erzeugt und der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum ermittelt werden. Jedes Massenspektrometer besteht grundsätzlich aus folgenden Einheiten:

- Die Ionenquelle: Ein Strahl gasförmiger Ionen aus einer Probe wird hier produziert. Durch die Art des Ionisierungsvorganges unterscheidet man die massenspektrometrischen Methoden: z. B. Elektrospray-Ionisation (ESI), Fast Atom Bombardement (FAB), Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation (SELDI) oder Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionization (MALDI).
- Der Massenanalysator: Die entstandenen Ionen werden nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) aufgetrennt. Die gebräuchlichen Analysatoren sind der Quadrupol-Massenfilter, die FT-ICR-Ionenfalle und die Flugzeit-Analyse (time of flight, TOF).
- Der Detektor: Ein Detektor liefert ein Massenspektrum, aus dem abgelesen werden kann, welche Ionen in welchen relativen Mengen erzeugt werden.
- Computereinheiten: Visualisierung der Daten und Auswertung.

1.2.3.1 Das Prinzip des MALDI-TOF Massenspektrometers

In der Arbeit wurde die MALDI-TOF Massenspektrometrie verwendet, weshalb im Folgenden auf diese Methode eingegangen wird. Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionization (MALDI) wird als Ionenquelle häufig in Kombination mit einem Flugzeitanalysator (TOF) angewendet, da dieser nur zusammen mit einer gepulsten Ionenerzeugung arbeiten kann.

Zur MALDI-Messung wird eine Probe auf einem metallischen Probenhalter aufgetragen und mit einer Matrix überschichtet, die bei der Laserwellenlänge eine hohe Absorption hat. Nach der Verdunstung des Lösungsmittels erfolgt eine Kokristallisation von Matrix und Analyt. Der Einbau der Probenmoleküle in das Kristallgitter der Matrix ist eine Voraussetzung für das Gelingen der Desorption/Ionisation. Der Probenhalter wird in die Ionenquelle des Massenspektrometers eingeführt, welche in einem Hochvakuum und einem starken elektrischen Feld steht. Beim Beschuss mit kurzen Pulsen (3 ns) eines hochenergetischen (10^6 - 10^7 W/cm²) UV-Lasers (meist 337 nm) absorbieren die Matrixmoleküle die Laserenergie und übertragen sie durch Relaxation in das Gitter des Probe-Matrix-Kristalls. So werden die Matrix- und Analytmoleküle desorbiert und in die Gasphase überführt (siehe Abb. 2). Neben der Energieübertragung stellt die Matrix, die zur Ionisierung notwendigen Protonen zur Verfügung, so dass die Proteine und Peptide positiv geladen werden. Die erzeugten Ionen werden durch ein elektrostatisches Feld in Richtung der Kathode (Detektor) beschleunigt und gelangen in den TOF-Analysator.

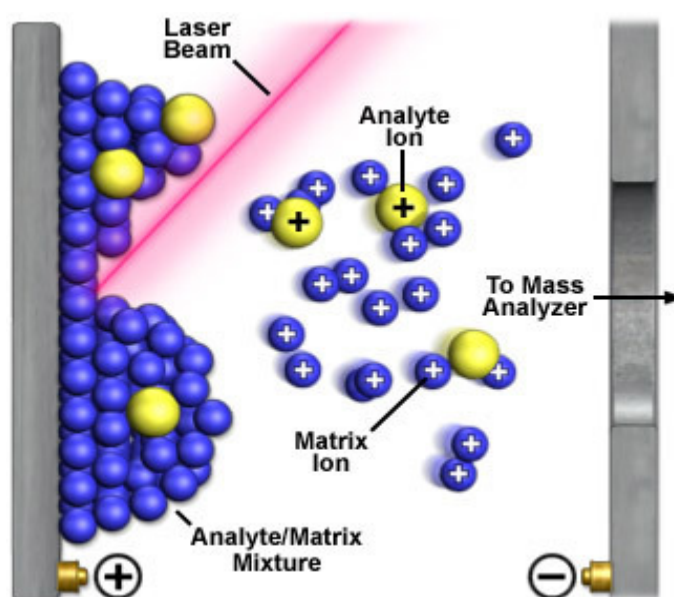


Abbildung 2: Schematische Darstellung der MALDI-Ionisierung

Vor der Untersuchung mit MALDI-TOF MS wird die Probe mit einer Matrix kokristallisiert. Durch die Bestrahlung eines gepulsten Lasers desorbiert die Matrix der Laserenergie. Dadurch werden Matrix- und Probemoleküle in die Gasphase überführt und ionisiert (Magnet Lab, 2009).

Für die Ionisation der Analytmoleküle spielt eine geeignete Matrix eine entscheidende Rolle. Häufig gebrauchte Matrices sind die organischen Säuren 2,5-Dihydroxy-benzoesäure, α -Cyano-4-hydroxymizsäure und Sinapinsäure (siehe Abb. 3). Voraussetzung für die Matrix ist das Vorhandensein eines π -Elektronensystems, welches eine Absorption im Bereich der verwendeten Laserwellenlänge ermöglicht. Weiterhin ist ein optimales Verhältnis zwischen

Analyten und Matrix (molares Verhältnis ca. 1:1000) auch wichtig. Der MALDI Prozess ist anfällig für höhere Salzkonzentrationen oder anderen Verunreinigungen, da diese Substanzen die Kristallstruktur der Matrix stören. Durch den Energietransfer werden Probemoleküle, wie Proteine, intakt freigesetzt und vor allem einfach positiv geladene Ionen durch Portionierung von basischen Aminogruppen, sowie die Seitenketten von Arginin, Lysin, Histidin und freie Aminogruppen, gebildet. Die Ionen werden in Richtung des Analysators beschleunigt.

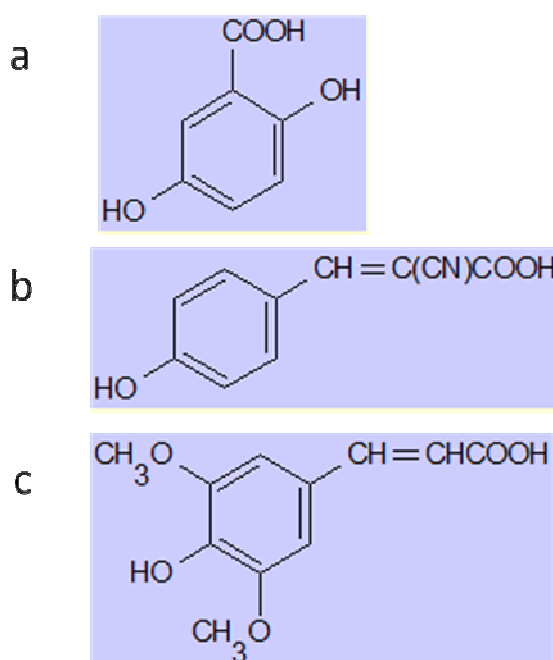


Abbildung 3: Häufig verwendete Matrizen für MALDI

a) 2,5-Dihydroxybenzoesäure (2,5-DHB); b) α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (CHCA); c) Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure)

Im TOF-Analysator erfolgt die Massenbestimmung über eine Messung der Flugzeit, die aus der Zeitdifferenz zwischen dem Start der Ionen in der Quelle und dem Auftreffen am Detektor ermittelt wird. Nach der Beschleunigung im elektrischen Feld der Quelle besitzen Ionen mit unterschiedlichen Masse/Ladung-Werten (m/z) zwar die gleiche kinetische Energie, aber verschiedene Geschwindigkeit. Hier fliegen die Ionen im Hochvakuum bis zum Detektor durch eine genau definierte feldfreie Driftstrecke, wo sie nach ihren m/z -Werten aufgetrennt werden. Große, weniger geladene Ionen benötigen für die gleiche Strecke aufgrund ihrer geringeren Geschwindigkeit mehr Zeit als kleine, höhergeladene Ionen. Je länger die Flugstrecke ist, desto besser die Auflösung. Bei festgelegter Beschleunigungsspannung und bekannter Flugstrecke kann aus der gemessenen Flugzeit das m/z -Verhältnis berechnet werden.

Nach Durchlaufen des Spannungsgefälles nehmen die ionisierten Moleküle die gleiche, definierte kinetische Energie E_{kin} an:

$$E_{kin} = zeU = \frac{m}{2} v^2 \quad (1)$$

Dabei beschreibt z die Ladungszahl des Ions, e die Elementarladung ($1,602 \times 10^{-19}$ C), U die Beschleunigungsspannung, m die Masse des Ions und v die Geschwindigkeit des Ions nach der Beschleunigungsstrecke.

Die Geschwindigkeit v ergibt sich aus der Flugzeit t und die Länge der feldfreien Driftstrecke des Flugrohrs L :

$$v = \frac{L}{t} \quad (2)$$

Durch den Einsatz von (2) in (1) ergibt sich:

$$\frac{m}{z} = \frac{2eU}{L^2} t^2 \quad (3)$$

Das Masse/Ladung-Verhältnis ist proportional zum Quadrat der Flugzeit. In der Praxis wird das Massenspektrometer mit Hilfe von Referenzsubstanzen mit bekannten Massen kalibriert. Nach sorgfältiger Kalibration ermöglicht die Anwendung des MALDI-TOF Massenspektrometers eine exakte Bestimmung von molekularen Massen.

Die Registrierung der Ionen erfolgt anschließend durch einen Detektor. Die Aufnahme des elektrischen Signals in Relation zur Flugzeit wird als Massenspektrum aufgezeichnet. Auf der Abszisse wird das Masse-zu-Ladungsverhältnis dargestellt und auf der Ordinate die Intensität in % zum stärksten Peak gegeben; die als 100% zugeordnet und deren absolute Intensität gezeigt wird. Die schematische Darstellung von MALDI-TOF MS Prozessen und ein entsprechendes Massenspektrum sind in Abbildung 4 illustriert. MALDI-TOF Massenspektrometer können im Linear- oder Reflektorbetrieb eingesetzt werden. Im linearen Verfahren fliegen die Ionen durch das lineare Flugrohr und erreichen an dessen Ende den Detektor. Der Reflektor besitzt ein entgegengerichtetes, leicht gewinkeltes elektrisches Feld, das etwas höher als das Beschleunigungsfeld eingestellt ist. Ionen mit gleichem m/z -Verhältnis, aber höherer Startenergie dringen tiefer in das Reflektorfeld ein und legen somit eine längere Wegstrecke bis zum Detektor zurück. Dadurch ist die Auflösung im Reflektorbetrieb deutlich besser als im Linearverfahren.

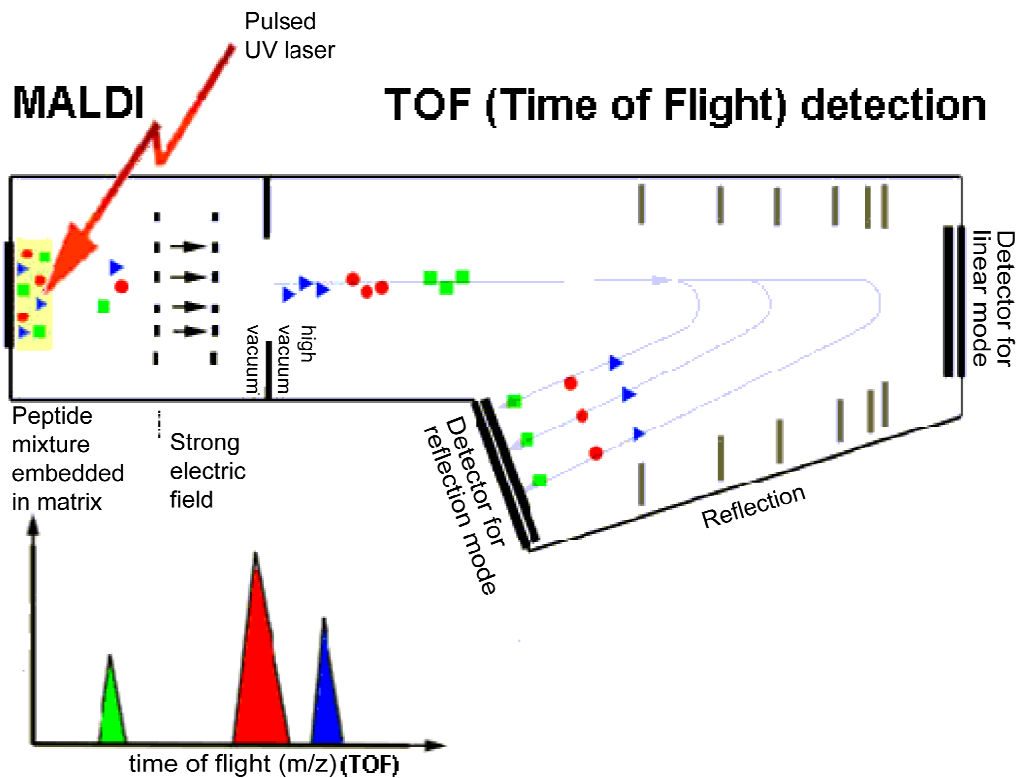


Abbildung 4: Schematische Darstellung der MALDI-TOF Massenspektrometrie

1.2.3.2 MALDI TOF/TOF Massenspektrometrie

Die MALDI-Quelle kann auch mit TOF/TOF-Instrumenten gekoppelt werden. Die TOF/TOF-Instrumente bestehen aus zwei unabhängigen TOF-Segmenten und einer Kollisionszelle, wodurch ein zweistufiger Prozess der Massenanalyse ermöglicht wird. Mit Hilfe von MALDI TOF/TOF MS ist es möglich, spezifische Ionen aus einem Ionenstrahl zu selektieren, diese zu fragmentieren und vielfältige Informationen über die Proteinsequenz zu gewinnen.

Im ersten TOF werden die Ionen anhand ihres m/z -Wert isoliert. Der sogenannte *time ion selector* lässt nur die ausgewählten Ionen passieren. Im zweiten TOF werden die Ionen in einer Stoßzelle durch Kollision mit einem Inertgas (Argon oder Stickstoff) fragmentiert und die daraus resultierenden Fragmente im zweiten Reflektor-TOF-Segment gemäß ihrer unterschiedlichen Geschwindigkeiten weiter getrennt.

Die MALDI-TOF/TOF MS wurde von Medzihradszky *et al.* (2000) erstmals für die Sequenzierung von Peptiden angewendet.

1.2.3.3 MALDI-TOF Massenspektrometrie zur Identifizierung

Die MALDI-Methode wurde 1988 erstmals für Proteine eingesetzt (Karas & Hillenkamp, 1988).

Die Massen der Moleküle werden in der MALDI-TOF Massenspektrometrie genau gemessen und produzieren ein Spektrum für jedes Bakterium. Die gemessenen Signale sind Zellbestandteile wie Peptide, Proteine, Ribonukleinsäuren und Lipide.

Die Probenvorbereitung ist einfach und schnell. Danach können die Spektren für jedes Bakterium in wenigen Minuten erzielt werden.

Für die Identifizierung braucht man zuerst eine Datenbank, die Referenzspektren von verschiedenen gut identifizierten Mikroorganismen enthält. Die Spektren eines unbekannten Isolats werden mit Referenzspektren der Datenbank verglichen. Passende Peaks werden statistisch bewertet und ermöglichen die Identifizierung eines Mikroorganismus mit einer definierten Ähnlichkeit. Durch den Einsatz einer spezifischen Software werden die Isolate auf Gattungs-, Spezies-, und Superspezies-Ebene identifiziert. Es gibt kommerzielle Software zur MS-basierten Identifikation von Bakterien: SARAMIS (Spectral Archive and Microbial Identification System) der Firma bioMérieux und die BioTyper der Firma Bruker, die in dieser Arbeit verwendet wurde.

Als eine der ersten Studien wurde die Differenzierung der Mikroorganismen mittels MALDI-TOF MS mit Extrakten von wasserlöslichen Proteinen durchgeführt (Cain *et al.*, 1994). Im Jahre 1996 wurde sie erstmals für die Untersuchung der intakten bakteriellen Zellen eingesetzt (Holland *et al.*, 1996). Danach wurde die MALDI-TOF MS zur Klassifizierung von vielen Mikroorganismen, insbesondere von klinisch relevanten Bakterien verwendet, z. B. *Bacillus anthracis* (Krishnamurthy *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2007), *Bacillus subtilis* (Demirev *et al.*, 1999) und *Bacillus* Sporen (Pribil *et al.*, 2005), *Citrobacter freundii* (Claydon *et al.*, 1996), *Coxiella burnetii* (Pierce *et al.*, 2007), *Enterobacter cloacae* (Pribil & Fenselau, 2005), *Francisella tularensis* (Krishnamurthy *et al.*, 1996), *Helicobacter pylori* (Nilsson, 1999), *Klebsiella aerogenes* (Claydon *et al.*, 1996), *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* (Hsieh *et al.*, 2008), *Salmonella typhimurium* (Pribil & Fenselau, 2005), *Staphylococcus aureus* (Du *et al.*, 2002; Jackson *et al.*, 2005; Majcherczyk *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Hsieh *et al.*, 2008) und *Yersinia pestis* (Krishnamurthy *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2007). Darüber hinaus wurden viele Gattungen mit MALDI-TOF MS charakterisiert wie z. B. *Arthrobacter* (Vargha *et al.*, 2006), *Burkholderia* (Vanlaere *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2007), *Campylobacter* (Mandrell *et al.*, 2005), *Cyanobacteria* (Erhard *et al.*, 1997), *Enterococcus* (Giebel *et al.*, 2008), *Escherichia* (Mazzeo *et al.*, 2006), *Haemophilus* (Haag *et al.*, 1998), *Listeria* (Barbuddhe *et al.*, 2008), *Mycobacterium* (Pignone *et al.*, 2006; Hettick *et al.*, 2006), *Pseudomonas* (Wahl *et al.*, 2002; Mazzeo *et al.*, 2006), *Salmonella* (Mazzeo *et al.*, 2006; Dieckmann *et al.*, 2008), *Staphylococcus* (Claydon *et al.*, 1996;

Carbonnelle *et al.*, 2007), *Streptococcus* (Hsieh *et al.*, 2008) und *Yersinia* (Mazzeo *et al.*, 2006; Lasch *et al.*, 2008). Nur in wenigen Fällen wurde die Untersuchung von Mischkulturen mittels MALDI-TOF MS beschrieben.

1.3 Natürliche Bakteriengemeinschaften

1.3.1 Der Westerhöfer Bach

Das Süßwasser ist einer der wichtigsten Lebensräume von Bakterien. Jeder Süßwasserlebensraum ist ein kleines geschlossenes Ökosystem und hat einen eigenen Nährstoffgehalt, Temperatur, sowie chemische und physikalische Eigenschaften. Unterschiedliche Süßgewässer besitzen verschiedene mikrobielle Gemeinschaften. In vielen Nischen wurden eng verwandten Bakterienstämme nachgewiesen (Jaspers & Overmann, 2004). Die Bakterienvielfalt im Süßwasser ist wesentlich geringer als in anderen Umgebungen. Deshalb ist es für die Erforschung der bakteriellen Gemeinschaften gut geeignet.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Westerhöfer Bach ausgewählt. Er ist ein stark kalkhaltiger Karstbach im Harz, Norddeutschland (51° 45'N, 10° 5'E). Der Bach ist ungefähr 10 cm tief und 2 m an seiner breitesten Stelle. Der pH-Wert des Wassers lag bei 7,3 bis 8,32, während die Temperatur 9,0 °C bis 10,2 °C betrug. Ferner wurde über die chemische Zusammensetzung des Westerhöfer Bachs berichtet (Brambilla *et al.*, 2007). Bedeutungsvoll ist im Bach der hohe Gehalt an Calcium und Magnesium, Mineralsalze, die im Laufe der Zeit zur Bildung von Kalktuffgestein führten. Um den Beitrag der beteiligten Mikroorganismen an der Bildung von Sedimente des Tuffsteins zu ermitteln, wurden die bakteriellen Gemeinschaften in diesem Bach untersucht.

In einer frühen Studie wurden 930 Isolate aus Wasserproben vom Westerhöfer Bach genommen. Davon gehörten 450 Isolate zur Gattung *Flavobacterium* (Brambilla *et al.*, 2007). Einige Isolate wurden als neue Typstämme der Gattungen *Flavobacterium* (Cousin *et al.*, 2007), *Pedobacter* (Muurholm *et al.*, 2007) sowie drei neuen Gattungen (Stackebrandt *et al.*, 2007, 2008; Verborg *et al.*, 2008) taxonomisch beschrieben.

Die Gattung *Flavobacterium* gehört zur Familie *Flavobacteriaceae* im Phylum *Bacteroidetes* (Bergey *et al.*, 1923). Flavobakterien sind Gram-negative, aerobe Stäbchen von 4 - 8 µm Länge, nutzen Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle und ihre Kolonien sind häufig gelblich gefärbt. Sie sind weltweit verbreitet und haben eine Vielzahl von verschiedenen Lebensräumen besiedelt, meistens in aquatischen Gebieten, wie Meer- und Süßwasser-

Umgebungen. Aufgrund der Vergleiche von 16S rRNA-Sequenzen emendierten Bernardet *et al.* (1996) die Beschreibung der Gattung *Flavobacterium*. Bernardet & Bowman (2005) geben einen Überblick über die Taxonomie und Ökologie von Mitgliedern der Gattung *Flavobacterium*. In den vergangenen Jahren wurden viele neue Arten der Gattung beschrieben, die aus Süßwasser-Sedimenten (Wang *et al.*, 2006), Boden (Yoon *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006), antarktischen Lebensräumen (McCammon & Bowman, 2000; Van Trappen *et al.*, 2003, 2004, 2005; Nogi *et al.*, 2005; Yi & Chun, 2006), dem Darm eines Regenwurms (Horn *et al.*, 2005), Gletschereis (Zhu *et al.*, 2003) und dem Granulat einer Kläranlage (Aslam *et al.*, 2005) isoliert wurden. Im Fluss Epilithon wurde eine reiche Vielfalt von Flavobakterien gefunden (O'Sullivan *et al.*, 2006).

1.3.2 Baumaterialien und Innenräume mit Feuchteschäden

Für Feuchteschäden in Gebäuden ist die Wasseraufnahme von Mauerwerk verantwortlich. Bei Leitungsschäden, bauphysikalischen Mängeln oder Umweltkatastrophen dringt Feuchtigkeit ein und führt zu sichtbarem Schimmelpilzbefall und/oder schlechter Raumluft. Im Rahmen epidemiologischer Studien wurden gezeigt, dass Baumaterialien mit Feuchteschäden einen Zusammenhang mit negativen gesundheitlichen Auswirkungen wie Husten, Schnupfen, Asthma, Infektionen der Luftröhre, Kopfschmerzen und Allergien auf die Bewohner hat (Spengler *et al.*, 1994; Sundell *et al.*, 1994; Koskinen *et al.*, 1999; Bornehag *et al.*, 2001; Haverinen *et al.*, 2001). Das Umweltbundesamt hat berichtet, dass in Deutschland in 33% der Wohnungen Feuchteschäden und in 14% der Wohnungen Schimmelpilzbefall auftreten (Szewzyk, 2009).

Bisherige Untersuchungen konzentrieren sich nur auf die Analyse von Schimmelpilzen; bisher besteht aber kein wissenschaftlicher Nachweis, dass gesundheitliche Beschwerden durch Schimmelpilzbelastung im Innenraum hervorgerufen werden (Fischer *et al.*, 2005; Fischer, 2010; Szewzyk, 2008).

Da die feuchten Baumaterialien im Innenraum neben Schimmelpilzen auch noch Bakterien enthielten – insbesondere Actinomyceten (Hyvärinen *et al.*, 2002; Lorenz *et al.*, 2002; Suihko *et al.*, 2009) – wurde diese Bakteriengruppe genau untersucht. Im Jahre 1970 beschrieb Schaal Infektionen mit *Nocardia* in einer Klinik und dem Vorkommen von *Nocardia farcinica* im Abrissstaub des Nachbargebäudes. Schäfer *et al.* (2010a) hatten 17 Wandmaterialien aus Gebäuden mit Feuchteschäden mit kultivierungsabhängigen und -unabhängigen Methoden analysiert und erfassten eine große Zahl von neuen Arten und Gattungen, zum Beispiel, *Brevibacterium sandarkinum* (Kämpfer *et al.*, 2010a), *Citricoccus parietis* (Schäfer *et al.*,

2010b), *Murinocardiopsis flavida* (Kämpfer *et al.*, 2010b), *Pseudonocardia parietis* (Schäfer *et al.*, 2009), *Prauserella muralis* (Schäfer *et al.*, 2010c) und *Promicromonospora umidemergens* (Martin *et al.*, 2010).

Actinobacteria sind prokaryotische, Gram-positive, unregelmäßig geformte stäbchenförmige Bakterien und Mycelbildner. Sie gehören zu den Gram-positiven Eubakterien, deren DNA einen hohen Anteil der Basen Guanin und Cytosin (G+C) von mehr als 55 mol% aufweist (Goodfellow, 1989; Madigan, 2001). Die Klasse *Actinobacteria* wurde 1997 von Stackebrandt *et al.* vorgeschlagen, um die große morphologische Diversität der Bakteriengruppe zu berücksichtigen. Zur Klasse der *Actinobacteria* gehören sechs Ordnungen *Acidimicrobiales*, *Rubrobacterales*, *Coriobacterales*, *Bifidobacteriales*, *Actinomycetales* und *Nitriliruptorales* (Sorokin *et al.*, 2009). Die Morphologie der Zellformen ist vielfältig. Es gibt sowohl Mikroorganismen mit einfachen Wachstumsformen, z. B. *Mycobacteriaceae* oder *Micrococcaceae* als auch Streptomyceten mit komplexen, filamentösen Formen (Goodfellow & Cross, 1984).

Viele Aktinomyceten sind in der Lage eine Vielfalt von Sekundärmetaboliten zu produzieren, die als Antibiotika, Cytostatika, Fungizide, usw. verwendet werden. Außerdem sind einige Aktinobakterien Krankheitserreger und produzieren ähnlich der Mycobakterien Toxine als Stoffwechselprodukte wie zum Beispiel Vertreter der Gattung *Streptomyces* (Puder, 1998).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Gegenwärtige Methoden zur Beschreibung mikrobieller Gemeinschaften sind meistens kostenintensiv und zeitaufwendig. Im Gegensatz dazu ist MALDI-TOF Massenspektrometrie eine schnelle und preisgünstige Methode. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die MALDI-TOF MS zur Charakterisierung von bakteriellen Gemeinschaften einzusetzen und auf ihre Anwendbarkeit zu überprüfen.

Im ersten Teil der Arbeit werden die Wasserprobe und *Flavobacterium*-Isolate aus dem Westerhöfer Bach mit MALDI-TOF MS betrachtet. Dafür werden die *Flavobacterium*-Typstämme zuerst mit der MALDI-Methode klassifiziert und danach die Isolate identifiziert. Weiterhin sollten die MALDI Ergebnisse mit denen von 16S rRNA-Gensequenzen verglichen werden.

Im zweiten Teil wurden die prinzipiellen Einsatzmöglichkeiten bei der Analyse bakterieller Gemeinschaften *in vitro* untersucht. Dabei wurden Ribosomen aus sechs Bakterienstämmen als Modell ausgewählt und daraus hergestellte unterschiedliche Mischungen mittels MALDI-

TOF MS differenziert. Parallel sollen die Möglichkeiten bzw. die Einflussfaktoren der Methode bestimmt werden. Die verschiedenen Versuchsansätze werden in Abbildung 5a illustriert. Anschließend wurden die MALDI-TOF & BioTyper Analysen für Mischkulturen der intakten Zellen durchgeführt um die Nachweisgrenzen dieses Systems zu ermitteln.

Im letzten Teil der Arbeit erfolgte die Anwendung der MALDI-Methode direkt auf Umweltproben. Dazu werden die Proben aus dem Innenraum mit Feuchteschäden benutzt. Die kultivierungsabhängigen und -unabhängigen (DGGE) Verfahren werden gleichzeitig für die Probe eingesetzt. Der Ablauf dieses Teils ist in Abbildung 5b dargestellt. Die Ergebnisse aus der MALDI-TOF & BioTyper Analyse sollten mit den Ergebnissen der anderer Verfahren verglichen und validiert werden.

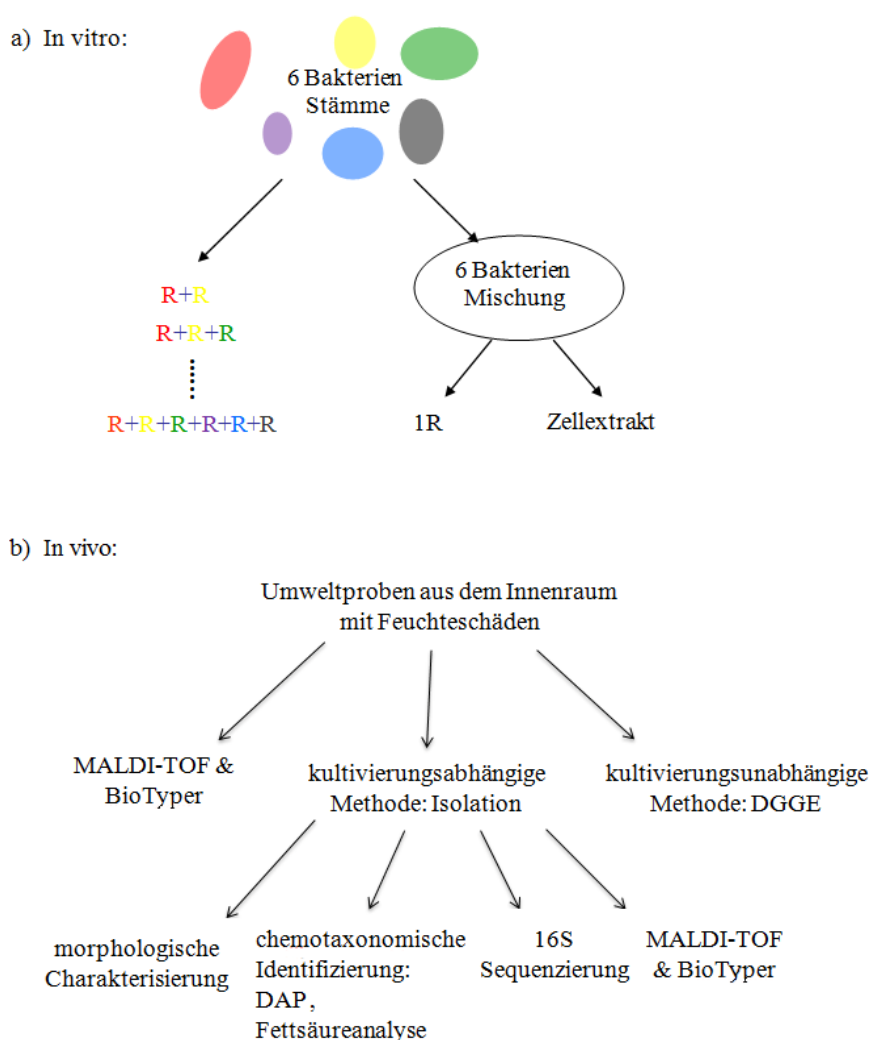


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Untersuchungsabläufe

a) *In vitro*: R stellt für Ribosom, verschiedenen Bakterien sind mit unterschiedlichen Farben markiert.
b) *In vivo*: die Umweltproben werden mit unterschiedlichen Methoden analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Nährmedien

Für die Vorbereitung aller angeführten Nährmedien wurden die Chemikalien des Reinheitsgrades „zur Analyse“ benutzt und von den Firmen Merck, Sigma, Riedel-de Haën, Fluka oder Mallinckrodt Baker B.V bezogen. Alternativ wurden manche Medien mit entsprechenden Fertigmedien nach den Vorschriften hergestellt. Alle Medien wurden mit frisch destilliertem Wasser angesetzt, der pH-Wert bei Bedarf mit 1N NaOH bzw. HCl eingestellt. Anschließend wurden die Medien bei 121°C für 15 min sterilisiert. Für Festmedien wurden 15 g Agar zugefügt.

Für Flavobacterium

R2A Agar (Difco):

Hefeextrakt	0,5 g
Proteose Pepton Nr. 3	0,5 g
Casaminosäure	0,5 g
Dextrose	0,5 g
Lösliche Stärke	0,5 g
Natriumpyrurat	0,3 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
MgSO ₄	0,05 g
Agar	15,0 g
Aqua dest.	1000 ml
pH	7,2

Zubereitung: 18,2 g Pulver des Fertigmediums wurden in 1 l Aqua dest. suspendiert, gut durchmischt, unter häufigem Schütteln erhitzt und zur vollständigen Auflösung des Pulvers 1 min lang kochen gelassen.

Für Ribosomenisolierung**R2A Bouillon (DSMZ M830):**

Hefeextrakt	0,5 g
Proteose Pepton Nr. 3	0,5 g
Casaminosäure	0,5 g
Glucose	0,5 g
Lösliche Stärke	0,5 g
Pyrurat	0,25 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
MgSO ₄	0,05 g
Aqua dest.	1000 ml
pH	7,2

Zubereitung: 0,5 g lösliche Stärke wurden zuerst in 200 ml Aqua dest. suspendiert und in der Mikrowelle erhitzt. Danach wurden die anderen Komponenten zugeben, alles wurde gut durchmischt, unter häufigem Schütteln erhitzt und zur vollständigen Auflösung des Pulvers vorsichtig erwärmt.

Nutrient Bouillon (Difco):

Pepton	5,0 g
Rinderextrakt	3,0 g
Aqua dest.	1000 ml
pH	7,0

Für die Sporenbildung wurden 10.0 mg MnSO₄ x H₂O zugegeben.

LB (Luria-Bertani) Medium:

Pepton aus Casein	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	10.0 g
Aqua dest.	1000 ml
pH	7,0

Casein-Soja-Hefeextrakt Bouillon (DSMZ M92):

Pankreatisch abgebautes Casein	17,0 g
Papainisch abgebautes Soja	3,0 g
Dextrose	2,5 g
NaCl	5,0 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g
Hefeextrakt	3,0 g
Aqua dest.	1000 ml
pH	7,2

Zubereitung: 30 g Pulver von Casein-Soja-Pepton Medium und 3 g Hefeextrakt wurden zusammen in 1 l Aqua dest. suspendiert. Alles wurde gut durchmischt und zur vollständigen Auflösung des Pulvers leicht erwärmt.

Casein-Soja-Pepton Medium (DSMZ M545):

Pankreatisch abgebautes Casein	17,0 g
Enzymatisch abgebautes Sojabohnenmehl	3,0 g
D-Glucose	2,5 g
NaCl	5,0 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g
Aqua dest.	1000 ml
pH	7,2

Zubereitung: 30 g Pulver wurden in 1 l Aqua dest. suspendiert. Alles wurde gut durchmischt und zur vollständigen Auflösung des Pulvers leicht erwärmt.

Für die Wandproben**Actinomyceten_Isolationsagar (Difco):**

Natriumcaseinat	2,0 g
Asparagin	0,1 g
Natriumpropionat	4,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,1 g
FeSO ₄	0,001 g
Agar	15,0 g
Glycerin	5 g
Aqua dest.	1000 ml
pH	8,1

Zubereitung: 22g Pulver des Fertigmediums wurden in 1000 ml Aqua dest. suspendiert. Alles wurde gut gemischt, unter Rühren erhitzt und zur vollständigen Auflösung des Pulvers 1 min kochen gelassen. 5g Glycerin wurden hinzugefügt. Außerdem wurde Natamycin entsprechend 2.9.2.1 zugegeben.

Brain Heart Infusion Agar (Difco):

Infusion von 200g Kalbshirn	7,7 g
Infusion von 250 g Rinderherz	9,8 g
Casein (Fleisch)-Pepton	10,0 g
Dextrose	2,0 g
NaCl	5,0 g
Na ₂ HPO ₄	2,5 g
Agar	15,0 g
Aqua dest.	1000 ml
pH	7,2

Außerdem wurde Natamycin entsprechend 2.9.2.1 zugegeben.

Casein-Mineral-Agar, entspricht CM-Agar:

K ₂ HPO ₄ oder	0,6 g
K ₂ HPO ₄ * 3 H ₂ O	0,77 g
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	0,5 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,05 g
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	0,1 g
KNO ₃	0,2 g
FeCl ₃ * 6 H ₂ O	0,01 g
Casein	0,8 g
Hefeextrakt	0,4 g
Agar	20,0 g
Aqua dest.	1000 ml
pH	7,2

Außerdem wurde Natamycin entsprechend 2.9.2.1 zugegeben.

Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (Sifin), entspricht CASO-Agar:

Pepton aus Casein	15,0 g
Pepton aus Sojamehl	5,0 g
NaCl	5,0 g
Agar	<u>15,0 g</u>
Aqua dest.	1000 ml
pH	7,3

Außerdem wurde Natamycin entsprechend 2.9.2.1 zugegeben.

Mineral-Agar:

Lösliche Stärke	20,0 g
KNO ₃	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,5 g
NaCl	0,5 g
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0,01 g
Agar	20,0 g
Aqua dest.	1000 ml
pH	7,2

Außerdem wurde Natamycin entsprechend 2.9.2.1 zugegeben.

Casein-Soja-Pepton-Bouillon (DSMZ, M535; Difco):

Trypticase soy broth	30,0 g
Agar	15,0 g
Aqua dest.	1000 ml
pH	7,3

Haferflocken-Agar (ISP 3-Agar)

Haferflocken	20,0 g
Agar	15,0 g
Spurenelementlösung	1 ml
Aqua dest.	1000 ml
pH	7,2
Spurenelementlösung	
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,1 g
Aqua dest.	100 ml

Die Haferflocken wurden in 1/3 Volumen 20 Minuten gekocht und dann durch ein Sieb filtriert. Anschließend wurden Spurenelemente und Agar hinzugefügt. Die Agarkolben wurden nach der Abfüllung schnell autoklaviert, um Klumpenbildung zu vermeiden.

2.1.2 Puffer**Puffer für Stomacher: Pepton-Salz-Lösung**

Pepton aus Fleisch	1,0 g
NaCl	8,5 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,6 g
pH	7,0

Puffer für Ribosomen Isolierung: TMA Puffer

Einzelkomponenten	Volumen (ml)	Endkonzentration
Tris-HCl (1M)	10	10 mM
NH ₄ Cl (2M)	50	0,1 M
MgCl ₂ x 6H ₂ O (1M)	10	10 mM
Sucrose (1M)	250	25 mM
DEPC Wasser	680	
Gesamtvolumen	1000	

Puffer für DGGE:**50 x TAE-Puffer**

Einzelkomponenten	Menge	Endkonzentration
Tris base	242 g	2 M
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	18,6 g	50 mM
Essigsäure (100%)	57,1 ml	1 M
Milli Q Wasser	1000 ml	
pH	8,3	

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 8,3 eingestellt.

1 x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA)

50 x TAE	100 ml
dd H ₂ O	4.900 ml

1 x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA)

Einzelkomponenten	Menge	Endkonzentration
Tris-HCl	10.8 g	89 mM
Borsäure	5.5 g	89 mM
Na ₂ EDTA (0,5 M)	4 ml	2 mM
Milli Q Wasser	1000 ml	
pH	8,3	

pH-Wert wurde mit Borsäure auf 8,3 eingestellt.

0% denaturierendes Acrylamid (0% UF, 8% AA)

40% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5 : 1)	20 ml
50 x TAE	2 ml
dd H ₂ O	ad 100 ml

100% denaturierendes Acrylamid (100% UF, 8% AA)

40% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5 : 1)	20 ml
50 x TAE	2 ml
Urea	42 g
Formamid	40 ml
dd H ₂ O	ad 100 ml

2.1.3 Chemikalien

Name	Firma
Acetonitril	Mallinckrodt Baker B.V, Holland
40% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5 : 1)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (HCCA)	Sigma, Louis USA
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma, Louis USA
DNA-Ladder (100 bp)	New England Biolabs GmbH, USA
Ethanol (absolut)	Mallinckrodt Baker B.V, Holland
Formamid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Glycerin P.A.	Merck, Darmstadt
Natamycin Konzentrat (86%-93%)	Add Food Service GmbH, Ascheberg
Roti-Quant, Proteinbestimmung nach Bradford	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trifluoressigsäure (TFA)	Merck, Darmstadt
SYBRGold®	MoBiTec, Göttingen

2.1.4 Bakterienstämme

Die in der Arbeit verwendeten Referenzstämme (siehe Anhang) stammten aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Deutschland. Die Bakterien-Isolate wurden aus Wasserproben und Baumaterial isoliert.

Isolate aus Wasser	jy 46- jy 69, jy 90-jy113
Mischkultur von klinischen Probe	jy 119
Mischkultur aus Milchprodukte	jy 126
Mischkultur von Fleischverderber	jy 131
Mischkultur von Bierverderber	jy 137
Baunmaterial Probe 1	jy 311
Probe 2	jy 312
Probe 3	jy 313

2.1.5 Kits

FastDNA® SPIN Kit for Soil Qiagen Kit

QIAGEN Taq DNA polymerase Kit

QIAquick PCR Purification Kit

2.1.6 Geräte

Tabelle 1: In der Arbeit verwendete Geräte

Gerät	Modell/Bezeichnung	Hersteller
Agarosegelelektrophorese Dokumentationssystem	Transilluminator T1	Biometra-Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
	Intas Gel Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Elektrophoresekammer	Horizon 11-14	Life technologies, Gaithersburg, USA
Autoklav	Tischautoklav 3150 EL	Systec GmbH , Wettengel
	Varioklav Dampfsterilisator 25 T	Biomedis, Gießen

Bead-Beater	Mini-Beadbeater	Biospec products, Inc. OK USA
Brutschrank	Kühlbrutschrank Typ ICP 600	Memmert GmbH, Schwabach
DNA-Sequenzierung	Sequencer CEQ 8000 Genetic Analysis System	Beckman Coulter, Inc. Fullerton, USA
DGGE-Apparatur	Ingeny PhorU System	Ingeny, Goes, Niederlande
EM-Dispenser	ceramus®-classic	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt
French Press	French Pressure Cell Press	Thermo Spectronic, USA
Gradientenmischer	Minipuls® 3	Gilson, Inc. Middleton, USA
Mikroskop	Zeiss Mikroskop AXIO-SCOPE	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Magnetrührer mit Heizung	MR Hei-Standard	Heidolph Instrument, Schwabach
MALDI-TOF MS	MALDI-TOF Benchtop System Microflex L20	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
MIDI	6890N Network GC System	Agilent Technologies, Waldbron
	7683 series injector	Agilent Technologies, Waldbron
Milchzentrifuge	Kammerseparatoren KA 05-00-105	Westfalia Separator, Oelde
PCR	Biozym Maxicycler PTC 100-60 HB mit Reaktionsblock	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf
	Veriti® 96 Well Thermal Cyclers	Applied Biosystems, USA
pH-Messgerät	765 Labor-pH-Meter	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. Berlin
	pH-Elektrolyt KCl 3 mol /L AgCl gesättigt (9811)	Mettler-Toledo Ingold, Inc. Bedford, USA
	766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. Berlin
Photometer	LKB Biochrom 4050 Ultrospec II	Lab Extreme, Inc, Kent City, USA
	Genesys 10-Series	Thermo Electron Corporation,

	Spectrophotometers	Madison USA
	Einmal-Küvetten, 1,5 ml Halbmikro, PS	Brand, Wertheim
	Nanodrop 1000 spectrophotometer	Peqlab biotechnologie GmbH, Erlangen
Pipetten	Eppendorf Research 0,5-10 µl, 10-100µl, 100-1000µl, 500-5000ml	Eppendorf, Hamburg
Reinstwasseranlage	Milli-Q Advantage A10	Millipore, Billerica, USA
Schüttelinkubator	Minitor	Ingfors HT, Bottmingen Switzerland
	RS-306	Ingfors HT, Bottmingen Switzerland
	Schüttler	Edmund Bühler GmbH Tübingen
Stereomikroskop	Stemi 2000C	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
	Stemi SR	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Sterilwerkbank	HeraSafe HS12 plus	Heraeus Instruments, Hanau
	HeraSafe ksp12	Thermo Scientific, Langenselbold
	Lamin Air Heraeus HLB 2472	Heraeus Instruments, Hanau
Stomacher	Stomacher® 80 Biomaster	Seward Laboratory Systems Inc., Bohemia, USA
Thermomixer	Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge	L8-70M	Beckman Coulter, Inc. Brea, USA
Vortexer	RCT basic	Janke & Kunkel, Staufen
Waagen	MasterPro LA 620P	Sartorius, Göttingen
	LC1200 S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Einhängethermostat 12b	Julabo Labortechnik GmbH,

		Seelbach
	Einhängethermostat 13	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Zentrifuge	Zentrifuge 5414R m. Rotor	Eppendorf, Hamburg
	Zentrifuge 5424R m. Rotor	Eppendorf, Hamburg
	Rotilabo [®] -Zentrifuge m. Butterfly-Rotor	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
	Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Zentrifuge	Du Pont Instruments, Bad Homburg
	Sorvall C-6 plus m. Fiberlite Festwinkelrotor SLC-3000	Thermo Fisher Scientific Waltham, USA

2.2 Wasserprobe

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Wasserproben entstammten alle dem Westerhöfer Bach in Harz, Niedersachsen, Deutschland.

2.2.1 Probenahme und Kultivierung der Isolate

Im Jahre 2005 wurden Wasserproben von Mitarbeitern der DSMZ genommen und analysiert. Von vier Standorten wurden die Wasserproben gesammelt und sofort auf Eis ins Labor gebracht. Ein Teil der Proben wurde für molekulare Untersuchungen bei -80°C eingefroren. Der restliche Teil wurde am selben Tag auf R2A Agarplatten ausgestrichen und bei 10°C bzw. 21°C bis zur 3 Wochen kultiviert.

Von den Platten wurden die Kolonien aufgrund ihrer verschiedenen Morphologie ausgewählt. Danach wurden Reinkulturen durch mehrfaches Ausstreichen gewonnen. Die Isolierung wurde von Frau Orsula Päucker und Evelyne Brambilla aus DSMZ durchgeführt. In dieser Arbeit wurden die Isolate von Flavobakterien mit der MALDI Technik untersucht.

2.2.2 Wasserprobenahme und Vorbereitung

Zum direkt Analysen der Umweltprobe mittels MALDI-Technik wurden 80 Liter Wasser im Jahre 2008 am Unterlauf der Westerhöfer Bach entnommen und in sterilen Gefäßen ins Labor

transportiert. Als Kontrolle wurden 25 ml Wasser in einem sterilen Falcon-Röhrchen genommen. 80 Liter Wasser wurde in einer Milchzentrifuge mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um Wasser von festen Bestandteilen abzutrennen. Das Pellet und das normale Wasser des Baches wurden bis zur MALDI-Messung bei -80°C gelagert.

2.3 Anzucht und Kultivierung der für Datenbank verwendeten Referenzstämme

Zur Anzucht der Referenzstämme wurden die Ampullen nach Anleitung unter sterilen Bedingungen geöffnet. Die gefriergetrocknete Kultur wurde in Röhrchen mit 5 ml des entsprechenden Flüssigmediums übertragen und für 10 Minuten bei RT als Vorkultur inkubiert. Dann wurde entweder Fest- oder Flüssigmedium mit der Vorkultur beimpft.

2.3.1 Kultivierung der *Flavobacterium*

Für *Flavobacterium*-Typstämme (siehe Anhang) wurden R2A Agarplatten verwendet, mit Ausnahme von *F. succinicans*, der auf M 67 angezogen wurde. Die Agarplatten wurden bei 28°C für 2-4 Tage bis zur sichtbaren Kolonienbildung inkubiert.

2.3.2 Kultivierung der *Actinomyceten*

126 Typstämme von Gattungen *Amycolatopsis*, *Citricoccus*, *Isoptricola*, *Jiangella*, *Kribbella*, *Nocardiopsis*, *Ornithinicoccus*, *Promicromonospora*, *Pseudonocardia*, *Saccharopolyspora* (siehe Anhang), 7 Stämme von *Promicromonospora citrea* und *Ornithinicoccus hortensis* wurden ausgewählt.

Zur Stammhaltung wurde ein Stamm in 10 ml Flüssigmedium (siehe 2.1.1) im Reagenz-Röhrchen auf dem Rundschüttler bei 105 rpm oder auf Festmedien kultiviert. Die Inkubationstemperatur betrug 28°C. Die Inkubation dauerte 4 Tage bis 2 Wochen.

2.4 Isolierungen der Ribosomen

2.4.1 Kultivierung der Bakterien

Für die Präparation von Mischungen wurden Ribosomen von verschiedenen Bakterien isoliert, und zusammen gemischt. Die folgenden Bakterien waren Spezies der DSMZ und wurden für diesen Versuch ausgewählt:

- Gram-negative Bakterien: *Escherichia coli* DSM 498
Sphingomonas paucimobilis DSM 30198
Flavobacterium aquidurens DSM 18293^T
Flavobacterium psychrophilum DSM 3660^T
Pseudomonas putida DSM 6125
- Gram-positive Bakterien: *Arthrobacter citreus* DSM 20133^T
Sporosarcina macmurdoensis DSM 15428^T

Die Bakterien wurden in 30 ml Nährmedium über Nacht angezogen. Von dieser Kultur wurden 300 µl des gleichen Nährmediums in einem 1 L-Erlenmeyerkolben beimpft und bei 110 rpm inkubiert. Die Inkubation der Kultur erfolgte bei 28°C, mit Ausnahme von *E.coli*, welches in LB-Medium bei 37°C kultiviert wurde. Die Anzucht von *S. paucimobilis*, *F. aquidurens* und *F. psychrophilum* erfolgte in R2A-Flüssigmedium (M830), während *P. putida* in Nutrient-Medium (M1) angezüchtet wurde. Für das Gram-positive Bakterium *A. citreus* wurde das Casein-Soja-Hefeextrakt Medium (M92) verwendet, für *S. macmurdoensis* Casein-Soja-Pepton Medium (M545).

Für eine zeitnahe Beurteilung des Wachstums wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm im Photometer ermittelt. Das steril filtrierte Medium wurde als Referenzwert verwendet. Die Bakterienkulturen wurden 6 bis 8 Stunden bis zum Erreichen einer OD_{578nm} von 1,0 inkubiert.

2.4.2 Ribosomenisolierung

Die Ribosomen wurden nach einer modifizierten Methode von Küntzel (1969) isoliert. Die komplette Isolierung wurde wie in Abbildung 6 mit vorgekühlten Lösungen auf Eis durchgeführt.

Mit dem Eintritt der Kultur in die exponentielle Wachstumsphase wurde die Zellmasse geerntet. Bei einer optischen Dichte von 1,0 wurde die Bakterienkultur 20 Minuten bei 4°C und 9.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellmasse mit 50 ml TMA Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Zellmasse ausgewogen und in 20 ml eiskaltem TMA Puffer resuspendiert. Die Zellwand wurde durch einstündige Inkubation bei 37°C nach Zugabe von Lysozym (Endkonzentration 1%) lysiert. Danach wurde das Bakterienlysat der Gram-negativen Bakterien zum Zellaufschluss zweimal durch die French-Press gegeben, für die Gram-positiven Bakterien sogar drei- bis viermal. Die anderen

Zellkomponenten wurden durch 5 minütige Zentrifugation bei 5.000 rpm, 4°C und weitere zwei Zentrifugationen (20 Min, 4°C bei 16.000 rpm) entfernt. Zur Gewinnung der Ribosomen wurde der resultierende Überstand in der Ultrazentrifuge bei 50.000 rpm und 4°C eine Stunde zentrifugiert. Die sedimentierten Ribosomen wurden vom Überstand separiert und bei –20°C eingefroren. Die Ribosomen wurden sowohl für direkte Messungen als auch für Mischungen verwendet.

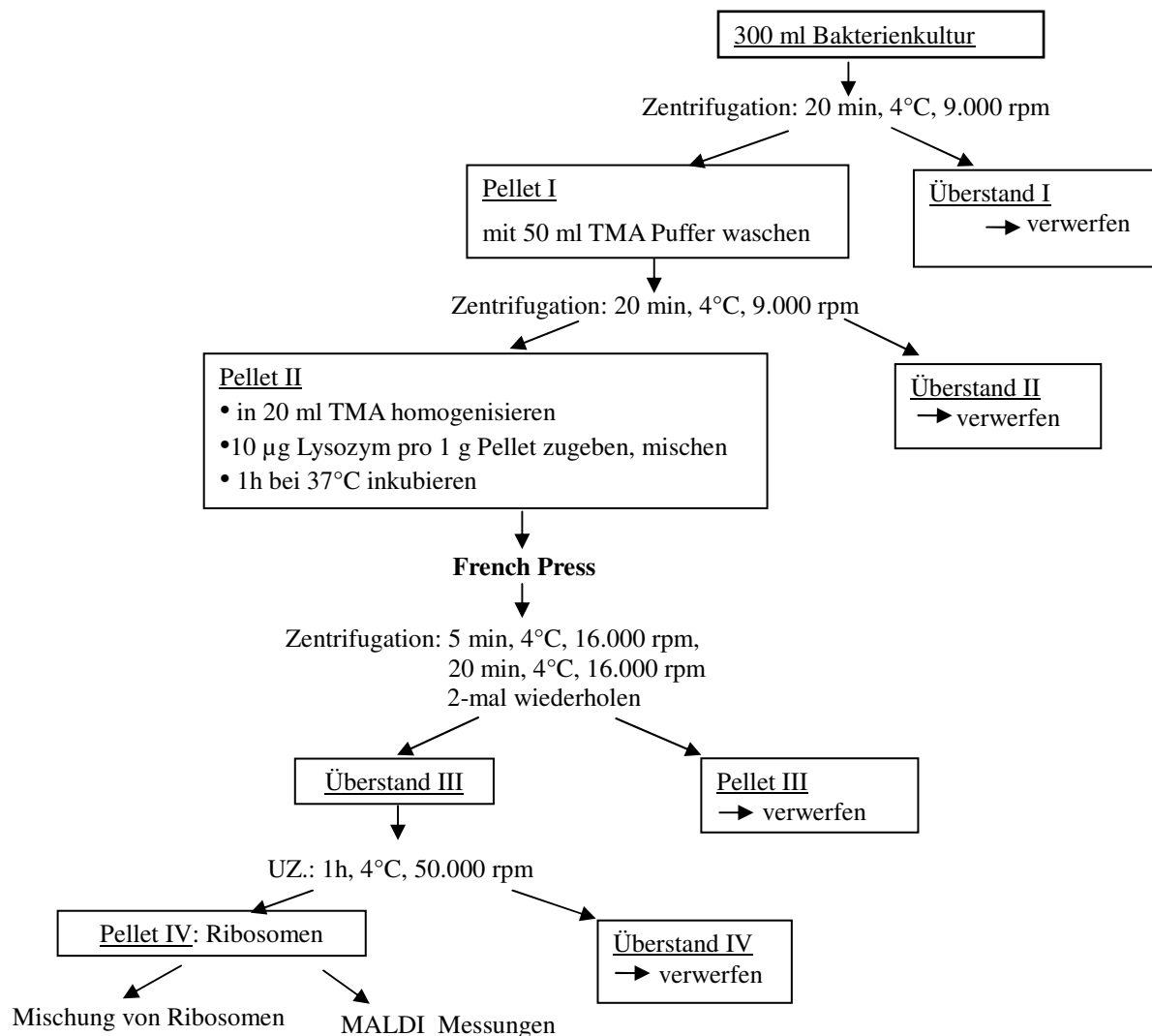


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Isolierung der Ribosomen

2.5 Untersuchungen der Mischungen

Für die MALDI Untersuchungen wurden verschiedenen Mischungen aus Zellen, Extrakten sowie Ribosomen im Labor hergestellt.

Bakterien-Reinkulturen und isolierte Ribosomen wurden zuerst mit MALDI gemessen und überprüft, ob sie Spektren liefern konnten.

2.5.1 Proteinbestimmung

Für eine quantitative Analyse wurde die Proteinkonzentration von Ribosomenpellets, die für die Mischungen verwendet wurden, nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Dafür wurde die Lösung Roti®-Quant vor Gebrauch im Verhältnis 1 zu 5 mit H₂O verdünnt und durch einen Faltenfilter filtriert.

Die Ribosomenproben wurden aufgetaut und in MilliQ Wasser homogenisiert. In einer Plastikkuvette wurden jeweils 20 µl Ribosomenprobe mit 1 ml Roti-Quant-Lösung vermischt. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die Referenz wurde mit 20 µl Wasser statt 20 µl Probe ermittelt. Für die Mischungen wurden erneut Suspensionen des Ribosomenpellets auf gleiche OD-Werte bei 595 nm eingestellt, so dass sichergestellt werden konnte, dass jede Ribosomen-Suspension die gleiche Menge Protein enthielt.

2.5.2 Qualitative und quantitative Analysen der Mischung von Ribosomen

Die Ribosomen von *E. coli* DSM 498 und *F. psychrophilum* DSM 3660^T wurden entsprechend der Protein Mengen im Verhältnis 1:1, 1:2, 2:1 in Eppendorf-Röhrchen gemischt. Danach wurden die Proben direkt auf das Target aufgetragen (siehe 2.10.3). Nach der MALDI-Messung wurden die Spektren von drei Mischungen miteinander verglichen, besonders die Intensitäten von wichtigen Peaks.

2.5.3 Herstellung der Mischungen isolierter Ribosomen

Um die Fähigkeit der MALDI-Technik für Mischkulturen zu prüfen, wurden Mischungen der aus definierten Stämmen getrennt isolierte Ribosomen hergestellt und mit MALDI untersucht. Die Ribosomen von verschiedenen Bakterien wurden aufgrund den Proteinnengen gleichmäßig gemischt. Das genaue Verfahren ist in Abbildung 7 schematisch illustriert.

Zuerst wurden die Ribosomen von *E. coli* und *S. paucimibilis* gemischt, dann die gleiche Zellkomponente von *F. aquidurens* zugegeben. Dann wurden *A. citreus* Ribosomen als Vertreter der Gram-positiven Bakterien zur Mischung gegeben und anschließend erfolgte der Zusatz von Ribosomen aus *P. putida*. Für die letzte Stufe wurde *S. macmurdoense* verwendet. Alle Mischungen wurden sofort präpariert, wie in 2.10.3 beschrieben.

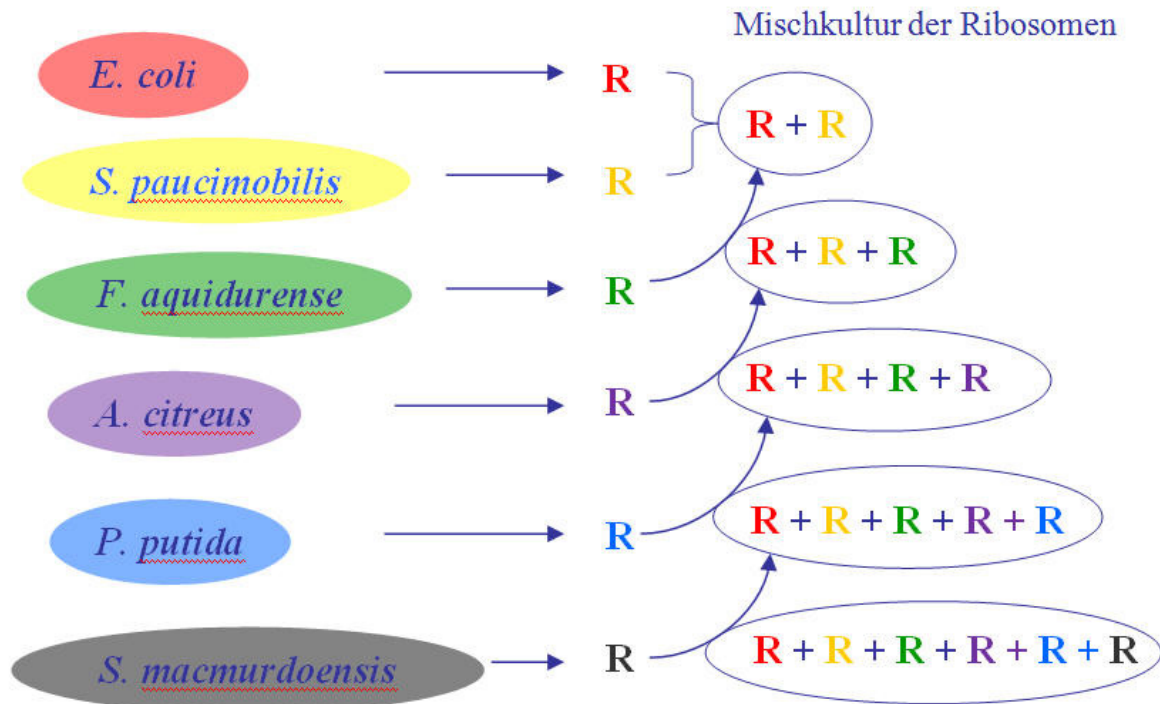


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Mischungen isolierter Ribosomen

R entspricht den isolierten Ribosomen. Die Farben stellen die verschiedenen Bakterien dar: *E. coli* rot, *S. paucimobilis* gelb, *F. aquidurens* grün, *A. citreus* lila, *P. putida* blau und *S. macmurdoensis* schwarz.

2.5.4 Zellextrakte und Ribosomen der 6-Organismen Mischkultur

Die in 2.5.3 verwendeten sechs Bakterienstämme wurden getrennt in R2A-Medium bei 28°C (*E. coli* 37°C) und 110 rpm gezüchtet. Von jedem Bakterium wurden 2 ml Kultur genommen, wie in 2.10.2.1, 2 beschriebenen extrahiert und im MALDI gemessen. Bei einer OD_{578nm} von 1,0 wurden jeweils 50 ml Bakterienkultur zusammengemischt. 10 ml der Mischung wurden wie die normalen MALDI-TOF Probe verarbeitet. Von den restlichen Mischungen wurden die gesamten Ribosomen isoliert und mit der MALDI-Technik analysiert.

2.6 Ansequenzierung der Peaks

2.6.1 *E. coli* Wachstum in verschiedenen Medien

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden feste und flüssige LB- und R2A-Nährmedien angewendet:

Kultivierung auf Agarplatten

Zunächst wurde *E. coli* K12 unter Standard-Bedingungen angezogen. Für jeden folgenden Schritt wurden Kolonien abgeerntet, extrahiert (2.10.2.1, 2) und mit MALDI analysiert.

1. Die Kolonien wurden gleichzeitig auf LB- und R2A-Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Nach der Bebrütung wurden die Kolonien abgeerntet.
2. Die Kolonien von LB-Agarplatten wurden auf frische R2A-Agarplatten überimpft und unter gleichen Bedingungen kultiviert.
3. Ebenso wurden die Kolonien von R2A-Medium auf LB-Medium übertragen und gezüchtet.

Kultivierung in Flüssigmedium

300 ml LB- und R2A-Flüssigmedium wurden in 1L-Erlenmeyerkolben mit 10 ml *E. coli* Vorkultur beimpft. Die Anzucht erfolgte für 12 Stunden bei 37°C auf einem Rundschüttler bei 110 rpm. Jede Stunde wurden Proben aus dem Kolben entnommen und folgende Verfahren durchgeführt: OD-Messung, pH-Wert Bestimmung und MALDI-Analyse.

➤ OD-Messung:

Das Bakterienwachstum konnte über die optische Dichte bei 578 nm im Photometer verfolgt werden. Das steril filtrierte Medium wurde als Referenzwert verwendet. 1 ml Zellsuspension oder 100 µl Zellsuspension mit 900 µl sterilem Medium wurden in Plastikkuvetten gemessen. Die OD-Messung erfolgt jeweils als Zweifachbestimmung.

➤ pH-Wert Bestimmung:

600 µl Proben wurden in ein 1,5 ml steril Reaktionsgefäß überführt und der pH-Wert mit Elektrolyt 9811 in Verbindung mit 765 Labor-pH-Meter gemessen.

➤ MALDI-Analyse:

1 ml Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und wie die MALDI Proben aus Flüssigkultur vorbereitet (2.10.2.1). Die Extrakte (2.10.2.2) der Zell-suspensionen wurden im MALDI untersucht.

2.6.2 Protein Sequenzierung mit MALDI TOF/TOF MS

Mit Hilfe der MALDI TOF/TOF Massenspektrometrie lassen sich drei Peaks des *E. coli* Spektrums sequenzieren und identifizieren. Nach 7 Stunden Inkubation in R2A-Flüssigmedium wurden *E. coli*-Zellen geerntet, wie die MALDI-TOF Probe präpariert und mit einem UltraflexTM MALDI TOF/TOF Massenspektrometer im Reflektormodus analysiert. Die erhaltenen Daten wurden mit dem Software Mascot (URL:

http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?SEARCH=MIS) mit einer Proteinsequenz-Datenbank verglichen und eine Rangfolge der Übereinstimmungen aufgestellt. Um die Ergebnisse der Proteinidentifizierung zu bestätigen, wurden die Proben auch mit ESI-MS untersucht. Die Messungen und Auswertungen wurden von Frau Anja Meier und Dr. Manfred Nimtz bei der Gruppe Biophysikalische Analytik im Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung durchgeführt.

2.7 Labormischungen (Blindversuch)

Für die Blindversuche wurden vier Mischungen durch Mitarbeiterinnen der DSMZ im Labor hergestellt. Jede Probe enthielt fünf Spezies.

Die verschiedenen Stämme wurden auf Agarplatten gezüchtet, dann in Flüssigmedien auf einen OD_{578nm}-Wert von 1,0 eingestellt. Anschließend wurden die Bakterien mit anderen gleichmäßig gemischt.

Es wurden folgende Proben mit der MALDI-Methode direkt analysiert:

Klinische Proben

- *Acinetobacter haemolyticus* DSM 6962
- *Enterococcus faecium* DSM 3146
- *Staphylococcus aureus* DSM 346
- *Klebsiella pneumoniae* DSM 799
- *Pseudomonas aeruginosa* DSM 1128

Milchprodukte

- *Lactobacillus gasseri* DSM 20243^T
- *Lactobacillus reuteri* DSM 17509
- *Bifidobacterium Longum* DSM 20088
- *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* DSM 20346^T
- *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* DSM 4902

Fleischverderbenden Organismen

- *Salmonella enterica* ssp. *enterica* DSM 4224
- *Listeria monocytogenes* DSM 20600
- *Kurthia gibsonii* DSM 20636

- *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni* DSM 4688^T
- *Brochothrix thermosphacta* DSM 20171^T

Bierverderbenden Organismen

- *Enterobacter cloacae* DSM 30054
- *Pectinatus cerevisiiphilus* DSM 20466
- *Alicyclobacillus acidocaldarius* ssp. *acidocaldarius* DSM 446^T
- *Megasphaera cerevisiae* DSM 20462^T
- *Pediococcus damnosus*

2.8 Innenraumprobennahme und Vorbereitung

2.8.1 Probenahme

Die Probennahmen erfolgten durch die Firma Dr. Frans Spaaij Fachlabor für Schimmelpilz-Diagnostik in Tübingen. Drei Baumaterialproben wurden aus dem jeweiligen Bauteil mit einer Kelle entnommen, sofort in sterile Kunststofftüten verpackt und an die DSMZ geschickt. Das Probenmaterial wurde bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

2.8.2 Probenvorbereitung mittels Stomacher

Jede Probe wurde mit der Laborwaage gewogen und im Verhältnis 1:10 (1g Probe + 9 ml Flüssigkeit) mit steriler Pepton-Salz-Lösung in einem Stomacherbeutel versetzt und 2 Minuten bei Stellung „High“ im Stomacher homogenisiert. Dadurch erfolgte die Trennung der Bakterienzellen vom Baumaterial.

Die bearbeitete Lösung einer Probe wurde in drei gleiche Teile aliquotiert, die für weitere MALDI-Untersuchungen, Isolierungen und DGGE verwendet wurden.

Zur Vermeidung des Wachstums von Bakterien in der Pepton-Salz-Lösung bei Raumtemperatur wurden die für MALDI-Messungen bzw. Isolierung eingesetzten Aliquots sofort weiter aufgearbeitet. Die übrigen Proben wurden bis zu den DGGE Analysen bei -20°C eingefroren.

2.9 Untersuchungen der Bakterien in Innenraum

Um zu wissen, welchen Bakterien in Baumaterialien mit den Feuchtigkeitsschäden im Innenraum vorhanden sind, wurden die Proben direkt mit der MALDI-Technik analysiert. Zum Vergleich der MALDI-Ergebnisse erfolgten die Identifizierungen der Proben mit kultivierungsabhängigen und molekularbiologischen Methoden.

2.9.1 MALDI Analyse der Innenraumproben

Die mit dem Stomacher vorbereiteten Proben wurden 30 Sekunden mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, die Pellets in Wasser-Ethanol-Mischung resuspendiert (2.10.2.1), mit einem Pistill gut homogenisiert und bei -20°C inkubiert. Vor den Messungen wurden die Extraktionen durchgeführt, welche identisch zur normalen MALDI Untersuchung (2.10.2.2) waren.

Zur Identifizierung wurde die eigens erstellte Datenbank „Bruker_Action_291010“ ausgewählt; darin wurden außer den Actinomyceten-Referenzspektren der Brucker Datenbank noch die in dieser Arbeit gemessenen Spektren von 134 Stämmen der Gattungen *Citricoccus*, *Isoptericola*, *Jiangella*, *Kribbella*, *Nocardiopsis*, *Ornithinicoccus*, *Promicromonospora*, *Saccharopolyspora* und *Pseudonocardia* (siehe Anhang) aufgenommen.

2.9.2 Kultivierungsabhängige Analysen

In diesem Teil wurden verschiedene Bakterien von Materialproben isoliert, mit morphologischen Merkmalen, Fettsäureanalyse und Bestimmung der Diaminopimelinsäure (DAP) so weit als möglich identifiziert. Die erhaltenen Ergebnisse wurden in einer Tabelle festgehalten. Alle konservierten Isolate wurden in MALDI gemessen und zur Bestimmung der 16s-Gensequenz an die Firma SeqLab in Göttingen versandt.

2.9.2.1 Kultivierung der Baumaterialproben

Zur Isolierung der Bakterien wurden fünf Nährmedien mit Zusatz von Natamycin (s.u.) verwendet: der Actinomyceten-Isolationsagar (im Weiteren AIA-Agar, Difco, Artikel-Nr. 212168), der Brain Heart Infusion Agar (im Weiteren BHI-Agar, Difco, Artikel-Nr. 609422), der Casein-Mineral-Agar (im Weiteren CM-Agar, Altenburger *et al.*, 1996), der Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (im Weiteren CASO-Agar, Sifin, Artikel-Nr. TN1031) und der Mineral-Agar nach Gauze (im Weiteren Gauze-Agar, Gauze *et al.*, 1983).

Meistens sind in Materialproben außer Bakterien noch Schimmelpilze vorhanden. Um das Wachstum von Schimmelpilzen zu hemmen, hat der Zusatz eines Antibiotikums in den für die Isolierung verwendeten Nährmedien eine große Bedeutung. Nach der Arbeit von Kämpfer *et al.* (2009) hat 0,1 g/L Natamycin Konzentrat (86%-93%) die beste Wirkung zur Wachstumshemmung der Schimmelpilze. Dazu wurden 0,1 g des Natamycins in 10 ml 96% Ethanol gelöst und einem Liter Nährmedium vor dem Autoklavieren zugegeben.

Nach der Verarbeitung im Stomacher wurden die Aliquots für die kultivierbaren Analysen innerhalb einer Stunde weiter bearbeitet: Von diesen Aliquots wurde sofort eine Verdünnungsreihe von 1:10 bis 1:100.000 mit Pepton-Salz-Lösung angefertigt. Von 100 µl der verdünnten Lösung wurde dann jeweils ein dreifach fraktionierter Ausstrich mit einer Impföse auf verschiedenen zur Isolierung verwendeten Nährmedien durchgeführt. Mit dem Deckel der Petrischalen nach unten wurden die Agarplatten 10 Tage bis drei Wochen bei 28°C kultiviert. Zur Subkultivierung wurden Casein-Soja-Pepton-Bouillon (DSMZ, M535) und der Hafermehlagar (ISP-3-Agar) ausgewählt.

2.9.2.2 Isolierungen

Von den für die Isolation geimpften Agarplatten (siehe 2.9.2.1) ausgehend, wurden Einzelkolonien mit unterschiedlicher Morphologie ausgewählt und durch fraktionierten Ausstrich Reinkulturen erzeugt. Nach 21 Tagen Kultivierung war keine neue Kolonie mehr erkennbar. Anschließend wurden alle makroskopisch sichtbaren Kolonien mit Hilfe einer Impföse aufgenommen, auf frische Isolierungsagarplatten (je ein Isolat pro Platte) übertragen und erneut bei 28°C gezüchtet. Jeden Tag wurde das Wachstum auf allen Platten kontrolliert. Nach einem Tag bis 3 Wochen Inkubation wurden die erhaltenen Einzelkolonien weiter überimpft. Dies wurde so lange durchgeführt bis nach mikroskopischer Kontrolle unter dem Stereomikroskop Reinkulturen existierten.

Die Reinkulturen wurden auf Subkultivierungsmedien (siehe 2.9.2.1) übertragen und mit dem Deckel der Petrischalen nach unten bei 28°C ein bis zehn Tage erneut kultiviert. Die Isolate dieser Agarplatten wurden für nachfolgende chemotaxonomische Analysen bzw. MALDI-Untersuchungen und Sequenzierung geerntet.

2.9.2.3 Identifizierung der Bakterien

2.9.2.3.1 Morphologischen Charakterisierung

Die morphologische Charakterisierung ist eine grundlegende Methode für die Reinheitskontrolle von Isolaten aus Umweltproben.

Mit Hilfe des Stereomikroskops (Stemi 2000C, Stemi SR) wurden die Subkulturen auf Identifizierungsmedien koloniemorphologisch klassifiziert. Folgende Beurteilungskriterien wurden berücksichtigt: Konsistenz der Kolonie (weich, schleimig, zäh), Kolonieform (flach, konvex), Oberfläche (glatt, wellig, gelappt, fällig) und Farbe der Kolonie. In einem Protokoll wurden die Merkmale der Isolate jener Nährmedien festgehalten, die zur Identifizierung verwendet wurden.

Die *Bacillus*-Isolate wurden visuell hinsichtlich Sporenbildung ausgewertet. Die Beschreibung der Zellmorphologie sowie Reinheitskontrolle von Plattkulturen wurden mit Hilfe eines Zeiss Mikroskops AXIO SCOPE und der Agar-Slide-Fixierung durchgeführt. Dazu wurde eine Kolonie in 70%iger NaCl-Lösung versetzt, davon ein Tropfen auf einem mit Agar dünn beschichteten Objektträger gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und im Mikroskop beobachtet. Die Dokumentation erfolgte mittels einer Digitalkamera.

Die EM Fotos wurden von Herrn Dr. Martin Westermann im Elektronenmikroskopischen Zentrum der Universität Jena hergestellt.

2.9.2.3.2 Fettsäuren

Die zellulären Fettsäuren sind als zelluläre Lipide mit einer Kohlenstoff-Kettenlänge von 9 bis 20 Atomen definiert. Fettsäuren haben unterschiedliche Strukturen: Kettenlänge, Vorhandensein von verzweigtkettigen (iso-, anteiso-) Fettsäuren, gesättigter und ungesättigter, zyklischen oder hydroxylierten Fettsäuren (Busse *et al.*, 1996). Die Zusammensetzung der Fettsäuren stellt ein chemotaxonomisches Merkmal für eine bestimmte Bakteriengattung oder -art dar. Deswegen erfolgt die Einordnung und Identifizierung einzelner Isolate durch einen Vergleich der Fettsäurezusammensetzung eines Mikroorganismus mit den Fettsäuremustern von Referenzstämmen. Zur Analyse werden Fettsäuren der Zelllipide als Methylester gaschromatographisch aufgetrennt und das Fettsäuremuster bestimmt.

Alle Isolate wurden auf dem Casein-Soja-Pepton Agar bei 28 °C für ein bis vier Tage inkubiert. Das Zellmaterial wurde mit der Impföse von den Agarplatte zu einem 4 ml Glasgefäß mit Teflonseptum übertragen. Eine Ausnahme waren die Aktinomyceten-Isolate, die in Röhrchen in 5 ml Casein-Soja-Pepton Bouillon auf einem Rundschüttler ein bis acht Tage angezogen wurden. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet in ein Glasgefäß gegeben. Bis zur Fettsäurenbestimmung wurde das Zellmaterial bei -20°C gelagert.

Um die Zellen zu lysieren und die jeweiligen Zelllipide verseifen zu können wurden ca. 40 mg geerntete Zellmasse mit 1 ml Reagenz 1 (45 g NaOH, 150 ml Methanol, 150 ml Aqua dest.) versetzt, 5-10 s auf dem Vortex suspendiert und für 5 min in einem Wasserbad bei 100

°C erhitzt. Die verschlossenen Glasgefäße wurden nochmals 5-10 s auf dem Vortex geschüttelt und weitere 25 min auf 100 °C erhitzt. Zur Bildung der Methylester wurde die auf RT abgekühlten Suspensionen mit 2 ml Reagenz 2 (325 ml 6N HCl, 275 ml Methanol) versetzt, gut vermischt, dann 10 min auf 80 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Probe in einem Eisbad schnell abgekühlt. Diese Lösung wurde mit 1,25 ml Reagenz 3 (200 ml Hexan, 200 ml Methyltert-butyl-äther) am Überkopfschüttler 10 min extrahiert. Von den beiden auftretenden Phasen wurde die untere Phase mit einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Die obere organische Phase wurde mit 3 ml Reagenz 4 (10,8 g NaOH, 900 ml Aqua dest.) gemischt und vorsichtig 5 min auf dem Überkopfschüttler geschüttelt, wodurch die freien Fettsäuren und Reagenzreste entfernt wurden. Zwei Drittel der gereinigten Phase wurden in Microvials überführt und verschlossen.

Die Fettsäuremethylester wurden gaschromatographisch (Agilent 6890N) mit dem Microbial Identification System (MIDI, Newark, USA) anhand der Standard Software des Systems analysiert.

2.9.2.3.3 Bestimmen der Diaminopimelinsäure (DAP)

Der DAP-Nachweis erfolgte nach einer modifizierten Methode von Rhuland *et al.* (1955). Mit einer sterilen Impföse wurden ca. 10 mg Reinkultur des Isolates von der Nährbodenplatte vorsichtig abgenommen und in einer Ampulle mit 200 µl 4M HCl versetzt. Die Ampulle wurde zugeschmolzen und über Nacht bei 100 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde das erhaltene Hydrolysat durch Filterpapier in einem Röhrchen überführt. Die Filtrate wurden am Vakuumrotationsverdampfer zur Trocknen eingeeengt und in 0,5 ml Aqua dest. aufgenommen. Zwecks vollständiger Entfernung der vorhandenen HCl, wurde die Lösung nochmals mit dem Rotationsverdampfer bis zur vollkommenen Trockenheit eingeeengt. Das so gereinigte Hydrolysat wurde in 20 µl Aqua dest. gelöst. Davon wurden 5 µl vom unteren Rand entfernt und auf eine DC-Cellulose-Alufolie 1 cm aufgetragen. Der Abstand der Proben betrug untereinander 1,5 cm. Als Standard wurden 5 µl einer Lösung von 5 mg/ml Dpm-Gemisches (Gemisch aus 2,6-Diaminopimelinsäure, DL-Ornithin, L-Lysin dihydrochloride und DL-2,4-Diamino-n-Butyninsäure) und Diaminobuttersäure aufgetragen.

Nach dem Verdampfen des Wassers wurde die Folie in die DC-Trennkammer gestellt, die in einer Höhe von ca. 0,5 cm mit dem Laufmittel nach Rhuland *et al.*, 1955 (Mischung aus 320 ml Methanol, 40 ml Pyridin, 70 ml Aqua dest. Wasser und 10 ml 12 M Salzsäure) gefüllt war. Die Trennzeit betrug 8 Stunden in der DC-Trennkammer, bis die Lösungsmittelfront ca. 1 cm Abstand zur oberen Kante der Folie erreichte. Die DC-Folie wurde aus der DC-Trennkammer

herausgenommen und die Lösungsmittelfront markiert. Anschließend wurde die Folie über Nacht im Abzug getrocknet.

Am nächsten Tag wurde die DC-Folie im Abzug mit 5 bis 10 ml Ninhydrin-Reagenz (1,25 g Ninhydrin Pulver, 233 ml mit H₂O gesättigte 1-Butanol, 17 ml konzentrierte Essigsäure) besprüht und nochmals für 5 min bei 100 °C erhitzt. Die DAP wird als dunkel grünbrauner Fleck, der sich nach einem Tag gelb färbt, auf der DC Platte erkennbar. Mit Hilfe der DAP-Referenzen wurde die DAP in den Proben identifiziert.

2.9.2.3.4 MALDI Identifizierung

Für MALDI-Messungen wurden die Reinkulturen der Isolate auf Casein-Soja-Pepton Agarplatten oder in Casein-Soja-Pepton Flüssigmedium herangezogen. Die Vorbereitungen und Extraktionen waren identisch zur normalen MALDI Untersuchung, welches in Kapitel 2.10.2.1, 2 beschrieben ist.

Um die Isolate zu identifizieren wurde die „Bruker_Action_291010“ Datenbank (siehe 2.9.1) verwendet.

2.9.2.4 Konservierung in Glycerinmedium (LGA)

1 ml Glycerin (wasserfrei) wurden jeweils in ein Mikrogefäße abgefüllt und sterilisiert. Es wurden 60 µl frische Kulturbühe oder ein bewachsenes Stück Agar in das Konservierungsmedium gegeben, gut gemischt und bei -20 °C gelagert.

2.9.3 Molekularbiologische Analyse

In Rahmen der Arbeit wurden molekularbiologische Methoden nicht nur für die taxonomische Identifizierung von Isolaten verwendet, sondern auch für die kultivierungsunabhängigen Untersuchungen in den Materialproben.

2.9.3.1 DNA Extraktion

Die DNA wurden aus den Isolaten oder direkt aus den Baumaterialproben extrahiert. Es war der erste und wichtige Schritt für alle molekularbiologischen Analysen.

DNA aus Isolaten

Zur molekularbiologischen Identifizierung von gewonnenen Isolaten wurden die genomische DNA aus Reinkultur der Isolate getrennt. Die Isolierung erfolgte mit Hilfe des Jetflex Genomic DNA Purification Kit (GENOMED 600100) nach Herstellerangaben.

DNA aus Materialproben

Um die gesamte DNA aus Baumaterialproben zu erhalten, wurde ein kommerziell erhältliches Extraktionskit (Bio 101, FastDNA Spin Kit for Soli) eingesetzt. Nach Anleitung des Herstellers wurde die Extraktion durchgeführt:

Die mitgelieferte Lysing Matrix E bestand aus 1 g eines Gemisches aus Keramik und Silika-Partikeln. 0,05g bis 0,5 g Materialproben wurden in einem Lysing Matrix E enthaltendem Reaktionsgefäß zugegeben, 987 µl Natriumphosphatpuffer (SPB) und 122 µl MT-Puffer dazupipettiert. Zum Zellaufschluss aller in der Probe vorhandenen Mikroorganismen wurde das mit Probe gefüllte Reaktionsgefäß eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit im Bead-Beater aufgeschlagen. Dann wurden die Proben bei 13.000 rpm bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Um Proteine auszufällen wurde der Überstand in einem neuen 2 ml Eppendorf-Röhrchen mit 250 µl PPS gemischt und vorsichtig 10-mal invertiert. Mit einer weiteren Zentrifugation erfolgte die Abtrennung von Zellbestandteilen, Verunreinigungen und ausgefällten Proteinen. Der DNA enthaltende Überstand wurde in einem 15 ml Falcon-Röhrchen mit 1 ml Binding Matrix Suspension überführt und für 2 Minuten invertiert, damit die DNA an die Matrix binden konnte. Die gesamte Matrixsuspension wurde in 600 µl Portionen auf einen Spin Filter gegeben und eine Minute bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Nach einem Waschschriff mit 500 µl SEWS-M (Salt/Ethanol Wash Solution) und zwei Zentrifugationen bei RT und 13.000 rpm wurde die DNA bei Raumtemperatur 5 min getrocknet und dann mit 50 µl DES (DNase- und pyrogenfreies Wasser) durch zweiminütiges Zentrifugieren eluiert. Eine Negativkontrolle, das Lysing Matrix E mit den zu Beginn eingesetzten Puffern ohne Probe, wurden parallel aufgearbeitet. Bei weiteren Schritten wurden die Kontrolle gleich wie die Proben behandelt.

Die Konzentration der DNA wurde mit dem NanoDrop-Gerät photometrisch bestimmt, weil die Mengen der DNA zu gering zum Nachweis auf dem Agarosegel waren. Jeweils 1 µl des DNA-Extraktes wurde direkt auf die Messeinheit des Gerätes gegeben. Zur Eichung des Spektralphotometers wurde 1 µl ddH₂O verwendet. Als Negativkontrolle wurde 1 µl TE-Puffer benutzt; die extrahierte DNA wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.9.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäurebereichen definierter Länge und definierter Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen (Saiki *et al.*, 1988). In der Arbeit wurden die Mikroorganismen aus den Baumaterialproben durch die Amplifikation eines bestimmten Abschnittes von 16S rRNA-Genen und anschließend DGGE-Analysen detektiert. Dafür wurden spezifische Primer angewendet.

Alle PCR-Reaktionen wurden unter einer Sicherheitswerkbank in sterilen 200 µl Reaktionsgefäß gemischt.

Reaktionsmix

Für die PCR-Reaktionen wurde das QIAGEN Taq DNA Polymerase Kit verwendet. Nach folgender Tabelle wurden alle Komponenten in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen als sog. Mastermix angesetzt. Der 10 x PCR-Buffer enthält 15 mM MgCl₂, die für die Einstellung der Ionenkonzentration hinsichtlich der DNA-Polymerase nötig ist. Die Primeren hatten eine Konzentration von je 50 pmol/µl. Das Volumen eines PCR-Reaktionsansatzes betrug jeweils 50 µl.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Reaktionsansätze (Mastermix) für die PCR-Reaktion

Substanz	Volumen (µl)	Endkonzentration
dd H ₂ O	28,4	
10 x Puffer	5	1 x
dNTP Mix (je 10 mM)	1	Je 0,2 mM
5 x Q-Solution	10	1 x
BSA (20 mg/ml)	1	0,4 mg/ml
Primer 1, forward (50 pmol/µl)	0,2	0,02 mM
Primer 2, reverse (50 pmol/µl)	0,2	0,02 mM
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,2	0,02 U/µl
Reaktionsvolumen	50 µl	

Nach kurzem Vortexen des Mastermixes wurden 46 µl Mastermix in einzelne 200 µl PCR-Reaktionsgefäße pipettiert. Dazu wurden jeweils 4 µl der DNA-Extrakte zugegeben.

Zu allen PCR-Reaktionen wurden parallel eine Negativ- und eine Positivkontrolle ergänzt. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz des Mastermix ohne DNA eingesetzt. Für die

Positivkontrollen wurden 4 µl genomische DNA von *Sandarakinorhabdus limnophila* verwendet.

Oligonukleotide (Primer)

Die PCR-Reaktionen für DGGE wurden mit den universal bakterielle Primer GC-341f und 907r durchgeführt, die an die 16s rRNA GenrRNA Gen der Bakterien binden. Die Primer GC-341f enthält eine GC- Klammer, die die PCR-Produkte in der DGGE am vollständigen Aufschmelzen hindert. Die Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon in Ebersberg hergestellt und sind nachfolgend aufgelistet.

GC-341f : 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CCC
TAC GGG AGG CAG CAG -3'

907 r : 5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3'

Das mittels PCR amplifizierte DNA-Fragment hat die Länge von 666 bp.

Reaktionsbedingungen

Die Reaktionsgefäße wurden dann in einen Veriti® 96 Well Thermocycler (Applied Biosystems, USA) gestellt und eine „step down“-PCR durchgeführt. Das heißt, dass zwei Teilabschnitte mit verschiedenen Temperaturbedingungen eingesetzt wurden. Der genaue Ablauf der PCR-Reaktion ist in der Tab. 3 dargestellt.

Tabelle 3: Ablauf der PCR für DGGE

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	3 Min.	1
Denaturierung	94°C	30 S	10
Annealing	63°C	30 S	
Elongation	72°C	45 S	
Denaturierung	94°C	30 S	25
Annealing	55°C	30 S	
Elongation	72°C	45 S	
Extension	72°C	3 min.	1
Abkühlen	4°C	∞	1

Agarosegelelektrophorese

Vor der DGGE-Analyse wurden die amplifizierte DNA mit einer Agarosegelelektrophorese kontrolliert. Je nach Größe des Gels wurde 1,2% Agarose in TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht und auf Handwärme abgekühlt. Dann wurde Ethidiumbromid (4 µg/ml) zugegeben und die Lösung in eine Gelkammer gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurden 3 µl der zu überprüfenden Ansätze in die Geltaschen aufgetragen. Zum Vergleich der Größe wurden 3 µl eines 100 bp-Markers in eine separate Geltasche pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte über einen Zeitraum von 40 Minuten bei einer Spannung von 110 V. Anschließend wurde das Agarosegel in einem UV-Transilluminator mit der Digitalkamera fotografiert.

2.9.3.3 Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE)

Nach der Vervielfältigung durch PCR erhielt man ein Gemisch von DNA-Fragmenten gleicher Größe, die lediglich in ihren Sequenzen untereinander variierten. Bei der Agarosegelelektrophorese wurden diese DNA-Amplifikate nicht aufgetrennt. Erst eine denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) ermöglicht die sequenzabhängige Trennung von DNA-Genabschnitten. Das Prinzip der DGGE wurde von Fischer und Lerman (1983) publiziert. Doppelsträngige PCR-Produkte wandern in einem Elektrophoresegel, das eine zunehmende Konzentration eines denaturierenden Agens enthält. Die DNA-Moleküle wandern bis zu der Schmelzposition im Gel, bei der DNA-Doppelstränge denaturieren und sich voneinander separieren. Die beiden Stränge, die von der GC-Klammer zusammengehalten werden und daher eine sperrige Struktur bilden, können nicht mehr weiter im Gel wandern. Die Position wurde von der Art und Häufigkeit der Bausteine einer DNA-Sequenz bestimmt. Das bedeutet, dass Genabschnitte mit verschiedenen DNA-Sequenzen unterschiedliche Schmelzpositionen aufweisen. Da ein aufgetrennter DNA-Strang im Gel als ein Doppelstrang stehen bleibt, kann man ein Gemisch von 16S rRNA-Genabschnitten mit DGGE trennen.

Herstellen des Polyacrylamidgels

Die Durchführung der DGGE erfolgte mit dem Ingeny phor U-2 System. Die Glasplatten und der Abstandhalter wurden mit Ethanol gereinigt und zusammen nach Angabe des Herstellers in die Kassettenklammern gestellt.

Ein Gradient der Harnstoff- und Formamidkonzentration von 30% bis 70% bzw. 80% wurde in 6%ige Polyacrylamidgelen hergestellt. Aus der Stammlösungen 0% und 100% wurden die

denaturierenden Lösungen A und B (die verschiedene Konzentrationen hatten) jeweils 24 ml entsprechend ihrer Zusammensetzung in 50 ml Falcon-Röhrchen pipettiert (Tab. 4). Um die Polymerisation zu starten, wurde jede Lösung mit je 100 µl 10%igem Ammoniumpersulfat (APS) und 5 µl Tetramethyldiamin (TEMED) versetzt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Lösung für DGGE

	Lösung A (30%)	Lösung B (70%)	Lösung B (80%)
0 % Lsg.	16,8 ml	7,2 ml	4,8 ml
100% Lsg.	7,2 ml	16,8 ml	19,2 ml
	24 ml	24 ml	24 ml

Zum Gießen der Gele wurde ein Gradientenmischer verwendet. In dessen rechte Kammer wurde Lösung A und in die linke (mit Haupthahn) Lösung B gegeben. Nach der Herstellung der Verbindung zwischen den zwei Kammern wurde das Gel über einen Schlauch – an dessen Ende sich eine Kanüle befindet – zwischen die Glasplatten gefüllt. Die Polymerisation des Gels dauert 60 Minuten. Danach wurde das Sammelgel (6 ml 0%iger Lösung + 100 µl 10%ige APS + 5 µl TEMED) mittels einer Spritze auf das Gradientengel gegossen.

Gelelektrophorese

Das Gefäß für den Laufpuffer wurde mit 1 x TAE-Puffer aufgefüllt und auf 60°C erhitzt und die Träger mit dem Gel in den Puffer gehängt. Um den Strom durch den im Träger laufenden Draht fließen zu lassen, wurde Puffer in die Mitte des Trägers eingefüllt. Danach wurden die PCR-Produkte ins Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurden zuerst 15 Minuten bei 200V und dann 16 Stunden bei 100 V und einer Temperatur von 60°C durchgeführt.

Färbung der DGGE Gele

Im Anschluss wurde das Gel 45 Minuten in 500 ml 1 x TAE mit 50 µl SybrGold® gefärbt und auf den UV-Transilluminator gelegt. Unter UV-Licht sind die Farbstoff-DNA-Komplexe als leuchtende Bande im Gel zu sehen. Das Fotografieren erfolgte mit einer Digitalkamera unter verschiedenen Belichtungszeiten.

Ausschneiden und Reamplifikation von DGGE Banden

Die nachgewiesenen DNA-Banden wurden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten, in 1,5 Eppendorf-Röhrchen überführt, die zuvor mit 20 µl ddH₂O gefüllt wurden. Um der DNA aus

den Acrylamidgelstücken zu eluieren, wurden die ausgeschnittenen Banden im Kühlschrank über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde die eluierte DNA in einer PCR-Reaktion mit Primer ohne GC-Kammer, d. h. 341f (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') und 907r reamplifiziert.

Die qualitative und quantitative Überprüfung der Reamplifikation erfolgte durch die elektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten in einem Agarosegel. Je 5 µl der PCR-Produkte wurden mit 1 µl 6 x DNA-Ladepuffer auf ein Agarosegel pipettiert. Die anderen Bedingungen waren identisch wie die der Agaroselektrophorese, welche in 2.9.3.2 beschrieben wurde.

Bei positiven Ergebnissen wurden die DNA mit QIAquick® PCR Purification Kit nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt und weiter sequenziert.

2.9.3.4 Sequenzierung

Für die Sequenzierung der 16S rRNA-Gene der gewonnenen Isolate sowie der interessanten DGGE-Banden wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977) verwendet.

Die Sequenzierung der 16S rRNA-Gene der gewonnenen Isolate wurde von der Firma SeqLab in Göttingen durchgeführt.

Die interessanten DGGE-Banden wurden mit GenomeLab™ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start kit von Beckman sequenziert. Das Kit enthält die Taq-Polymerase und die fluoreszenzmakierten Didesoxynukleotide. Dafür wurden die Primer 357f bzw. 900r in einer Konzentration von 0,025 µg/µl eingesetzt.

357 f 5' -TAC GGG AGG CAG CAG -3'

900 r 5' -CCG TCA ATT CAT TTG AGT TT -3'

Die Reagenzien des Ansatzes für die Sequenzierung sind in der Tab. 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Zusammenfassung des Sequenzieransatzes

Substanz	Menge
dd H ₂ O	4 µl
Beckman Terminator	3 µl
Primer	1 µl
PCR-Produkt	2 µl

Die PCR-Reaktion wurde im Biozym Maxicycler PTC 100-60 HB (mit Reaktionsblock) durchgeführt. Die Bedingungen dieser Reaktion sind nachfolgend dargestellt:

Tabelle 6: Bedingungen der PCR-Reaktion während der Sequenzierung

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	96°C	20 S	30
Annealing	50°C	20 S	
Elongation	60°C	4 Min	
Abkühlen	4°C	∞	1

Die Sequenzierung wurde in einem Kapillarsequenzierer (Beckman) und von Frau Nicole Mrotzek durchgeführt.

Auswertung der Sequenzen

Die nach dem Sequenzieren vorliegenden Rohdaten wurden mit dem CEQTM 8000 Genetic Analysis System analysiert und auf die richtige Länge geschnitten. Die erhaltenen Chromatogramme wurden in der Software Chromas 2.23 eingelesen und deren Qualität überprüft. Anschließend wurden die Sequenzen mittels „BLAST“ (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) mit dem zur Verfügung stehenden Sequenzen der NCBI-Datenbank verglichen. Dabei wurden die Referenzsequenzen mit der größten Übereinstimmung ermittelt und die unbekannten Sequenzen zur groben taxonomischen Erteilung charakterisiert. Für die Nachbearbeitung der Sequenzen wurden diese mit den ermittelten Referenzsequenzen aligniert und anhand der Chromatogramme Korrektur gelesen.

2.10 MALDI-TOF Massenspektrometrie Analytik

Alle verwendeten Materialien (1,5 ml Reaktionsgefäß, 1000 µl, 100 µl und 10 µl Pipettenspitzen) sollten steril sein. Die Chemikalien waren für HPLC- und MALDI-Techniken geeignet.

Die Reinigung des Proben Targets wurde nach der Anleitung von Bruker GmbH durchgeführt: zunächst wurde das Target 5 Minuten in 70%igem Ethanol eingeweicht, dann die Target Oberfläche mit sauberem Papier sorgfältig gereinigt und in der Luft getrocknet. Anschließend wurde das Stahltarget mit ein paar Tropfen Ethanol bedeckt und mit fusselfreiem Papier getrocknet.

2.10.1 Präparation der Matrix

Für die Herstellung der Matrix wurde 10 mg α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (HCCA) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 487 μ l Milli Q Wasser, 500 μ l Acetonitril und 12,5 μ l TFA gemischt. Die Matrixmischung wurde im Thermomixer bei RT und 1350 UPM gemixt, bis die HCCA gesättigt war.

Vor dem Auftragen wurde die Mischung kurz gevortext, 30 Sekunden zentrifugiert und der klare Überstand als Matrix gebraucht.

2.10.2 Vorbereitung der Bakterien

Um die Zelle bzw. verschiedene Komponenten der Zellmasse, wie die Extrakte der Zellen oder die isolierte Ribosomen, in MALDI-TOF Massenspektrometern zu messen, wurden die Bakterien auf Agarplatten oder in Flüssigmedien gezüchtet.

2.10.2.1 Probenpräparation

Probenpräparation mittels Agarplatten:

Die Bakterien auf einer Agarplatte wurden mit einer abgeflamten Impföse geerntet. Dazu wurden die Kolonien mit der Impföse abgeschabt und in einem Reaktionsgefäß mit 300 μ l sterilem Milli Q Wasser suspendiert. Danach wurden 900 μ l absoluter Ethanol hinzugeben, zuerst mit der Pipette und anschließend durch Vortexen sorgfältig vermischt. Die Zugabe von Ethanol gewährleistete zum einen Inaktivierung, zum anderen Fixierung. Für die Messungen der ganzen Zellen oder der Extrakte sollten die Bakterien-Ethanol-Lösungen mindestens über Nacht, bei -20°C inkubiert werden. Danach sind die Suspensionen über einen langen Zeitraum stabil.

Probenpräparation aus Flüssigkultur:

1 ml Flüssigkultur wurde in einem Reaktionsgefäß bei 13.000 UPM 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zentrifugation erfolgte zweimal, damit das Medium komplett entfernt werden konnte. Anschließend wurde das Pellet mit 300 μ l Wasser versetzt. Für Aktinomyeten-Stämme oder Mischkulturen wurde die Lösung zusätzlich mit einem Pistill homogenisiert. Die weiteren Schritte wurden wie bei der Präparation mittels Agarplatten dargestellt, durchgeführt.

2.10.2.2 Extraktion des Bakteriums

Die Extraktion wurde laut der Vorschrift von Bruker GmbH „Ethanol/Ameisensäure Extraktion“ unter dem Abzug durchgeführt. Nach dem über Nacht Einfrieren wurde die Bakterien-Ethanol-Lösung bei 13.000 UPM für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um Ethanol vollständig zu entfernen erfolgte die Zentrifugation des Pellets nochmals unter gleich Bedingungen. Der Überstand wurde abpipettiert. Dann wurden 50 µl Acetonitril zum Pellet hinzugeben und resuspendiert. Daraufhin wurden 50 µl 70%ige Ameisensäure hinzugefügt und durch Pipettieren gründlich vermischt. Nach kurzem Vortexen wurde die Mischung 3 Minuten lang bei 13.000 UPM zentrifugiert. 100 µl des Überstands, welcher den bakteriellen Extrakt enthielt, wurden sofort in ein neues Reaktionsgefäß eingeführt. Die Extrakte konnten bei -20°C zwei bis drei Wochen stabil gelagert werden.

2.10.2.3 Vorbereitung der ganzen Zellen

Die Bakterien-Ethanol-Lösung wurde bei 13.000 UPM für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde die Zentrifugation einmal wiederholt. Das Pellet wurde in 100 µl Milli Q Wasser gelöst und durch Vortexen homogenisiert. Die Suspension wurde direkt auf das MALDI-Target aufgetragen.

2.10.2.4 Vorbereitung der Ribosomen

Die Isolierung der Ribosomen wurde in 2.4 beschrieben. Das Pellet wurde aufgetaut, mit Wasser gespült und in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Anschließend wurden 100 µl Milli Q Wasser zugegeben und das Pellet mit einer Pipette resuspendiert.

2.10.3 Präparation auf dem Target

1,5 µl der Probelösung wurden auf einen Spot des Stahltargets aufgetragen und 5 Minuten an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die Probe mit 1,5 µl der Matrixlösung überschichtet und wieder an der Luft getrocknet. Jeder Stamm wurde auf acht Positionen in eine ganze Spalte des Targets aufgetragen, wie in Abbildung 8 gezeigt.

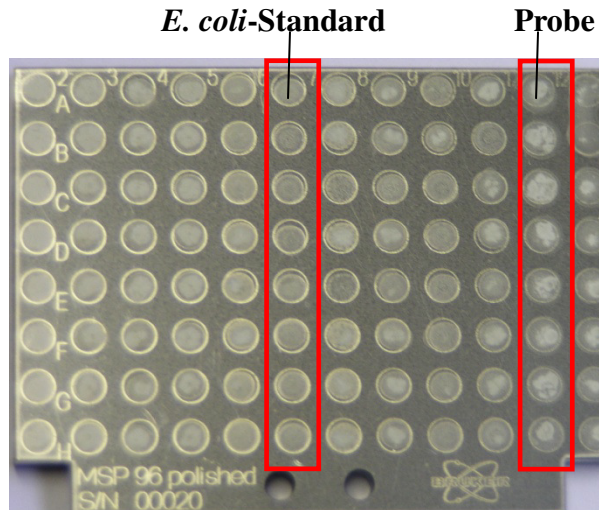


Abbildung 8: Proben­target zur MALDI-Messung

Jede Probe wird auf den Analysenpositionen von einer ganzen Spalte aufgebracht, erst die Probe und dann mit der Matrix bedeckt. Der *E. coli* Standard wird in der Spalte 6 aufgetragen.

Nach dem Eintrocknen des Probe-Matrix-Gemisches wurde das beladene Target sofort massenspektrometrisch analysiert.

Die externe Kalibrierung des Massenspektrometers erfolgte bei jedem Lauf neu mit Hilfe einer Extraktion von *E. coli* K-12 (DSM 498). Der Stamm wurde auf Nutrient-Agar bei 37°C für einen Tag gezüchtet und wird genauso wie in 2.10.2.1, 2 beschrieben extrahiert, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu sichern. Die *E. coli*-Extraktion wurde auf der mittleren Reihe des Targets (Spalte 6) aufgetragen (Abb. 8). Nach Einbringen des Proben­trägers in die Ionenquelle des Massenspektrometers wurde ein Spektrum von *E. coli* aufgenommen. Es war zu beachten, dass das Vakuum bis ca. 10^{-7} mbar reichen und alle relevanten Parameter, wie Laserintensität, Beschleunigungsspannung usw. den Einstellungen der folgenden Analytmessung entsprechen sollte. Das generierte Spektrum wurde manuell mit 10 Massen kalibriert, besonders der bei 10.137,01 Da und 10.299,09 Da. Es dient zur Kalibration der Methode im automatischen Programm und es wurde eine Massengenauigkeit von 100 ppm erreicht.

2.10.4 Messungen

Die Messungen wurden auf einem Microflex L20 Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonics GmbH vorgenommen. Unter Verwendung der FlexControl (Version: 2,4) und FlexAnalysis (Version: 2,4) Software (Bruker Daltonics, Bremen) wurden die Proben automatisch im positiven, linearen Modus gemessen. Durch einen eingebauten Stickstoff-Laser, der auf eine Frequenz von 200 Hz und einer Wellenlänge von 337 nm eingestellt war,

wurden Ionen produziert und beschleunigt. Die Beschleunigungsspannung betrug 20 kV. Der Aufnahmebereich wurde auf 2.000–20.000 m/z gesetzt. Für ein MS-Spektrum wurden 240 Laserschüsse ausgeführt und aufaddiert, von denen jeweils 40 Schüsse auf einer Position des Spots gemessen wurden.

Vor Beginn der automatischen Messung wurde die nötige Laserenergie ermittelt und in der Software gespeichert. Mit einer Excel-Datei und dem Verarbeitungsprogramm Flex-Control wurden die Messpunkte auf dem Target koordiniert. Es wurden zwei verschiedene Abtastverfahren für den Laser getestet. Der Laser folgte dabei entweder einem hexagonalen oder einem zirkulären Abtastmuster. Die Kalibrierung wurde automatisch anhand der *E. coli*-Spots auf dem Target gemacht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für jede Probe 8 Spots vorbereitet und jeder Spot zweimal gemessen. Bei der Messung lief das Programm FlexAnalysis im Hintergrund und stellte die Akzeptanzkriterien für die jeweilige Probe her. Nur die zu den Akzeptanzkriterien passenden Subspektren wurden ausgewählt und aufsummiert. Insgesamt waren 16 Spektren für eine gemessene Probe vorhanden.

2.10.5 Verarbeitung mit FlexAnalysis

Um die Qualität des einzelnen Spektrums zu überprüfen, wurden die Massenspektren in der Software FlexAnalysis unter selektiver Bedingung aufgezeichnet. Mit dem gespeicherten Programm wurden die Peaks automatisch erkannt, beschriftet und daraus resultierend eine Peaklist generiert. Eine Peaklist umfasst die Daten eines Spektrums sowie die Gesamtheit der charakteristischen Peaks mit den entsprechenden Massen. Die Spektren, deren Peakintensität geringer als 2.000 war, wurden später manuell gelöscht, ebenso die kontaminierten Spektren. Das gemessene Massenspektrum weist einen für die Mikroorganismen eindeutigen und charakteristischen molekularen „Fingerabdruck“ auf und stellt die Grundlage für die Recherche in der Biotyper Software dar.

2.10.6 BioTyper Datenbank und Identifizierung

Die so generierten Massenspektren wurden mittels der kommerziell erhältlichen Software BioTyper™ 2.0 (Bruker Daltonik GmbH) ausgewertet, damit eine Klassifizierung möglich ist. Über einen etablierten bioinformatischen Algorithmus, der auf einer „Principle Component Analysis“ (PCA) basiert, wurden die Ähnlichkeitsgrade zwischen massenspektrometrischen Profilen ermittelt.

Die Software wird mit einer umfangreichen Referenzdatenbank geliefert, in der mehr als 3000 Spektren von gut charakterisierten Referenz- und Laborstämmen gespeichert sind. In dieser Arbeit wurde eine eigene Datenbank mit Referenzspektren generiert. Die ermittelten Massenspektren von unbekannten Bakterienspezies wurden mit den bestehenden Spektren der Referenzdatenbank verglichen. Dabei ergab sich eine Ähnlichkeit zwischen dem Massenspektrum eines zu identifizierenden Keimes mit den Spektren aus der Bruker Datenbank. Diese Auswertung der Daten erzeugt einen Ähnlichkeitswert, sog. Log (score)-Wert, der die statistische Signifikanz der Bakterienidentifikation ausdrückt.

Durch verschiedene Funktionen kann man einen unbekannten Mikroorganismus bis auf Speziesebene identifizieren und in Dendrogramme einordnen.

Zuerst wird ein „main spectrum“ (MSP) aus mehreren Spektren mit Hilfe einer statistischen Auswertung und Gewichtung aller Daten dieser Spektren generiert. Es werden die Signale der Einzelspektren auf Organismen-spezifische (Genus-, Spezies- oder Stamm-spezifische) Signale reduziert. In einem „main spectrum“ wird sowohl die Durchschnittsintensität der einzelnen Peaks (in Abb. 9 Blau dargestellt) als auch deren Häufigkeitsverteilung (in Abb. 9 Rot dargestellt) angezeigt. Eine Gruppe solcher „main spectra“ kann zu einer Datenbank gespeichert werden, mit der unbekannte Bakterien verglichen werden können.

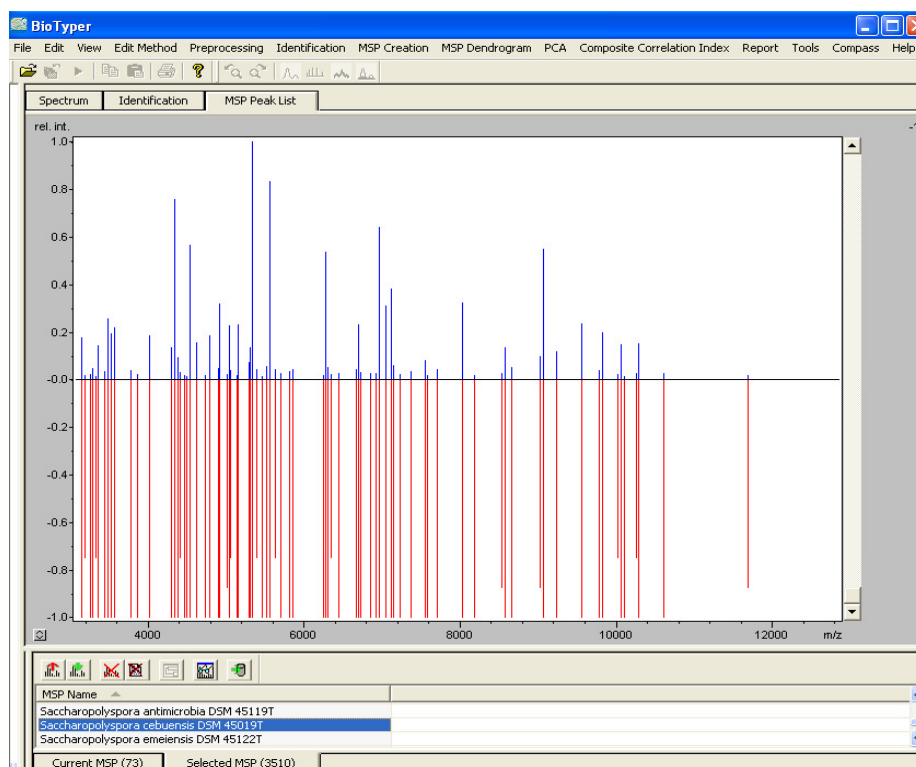


Abbildung 9: Ein „main spektrum“ eines ausgewählten Stamms

Relative Peakintensitäten des Spektrums blau dargestellt und die Häufigkeitsverteilung entsprechender Peaks rot.

Die Identifizierung einer neuen Probe erfolgt durch Vergleich der ermittelten Messdaten von unbekannten mit den bestehenden Spektren der Referenzdatenbank. Eine Bestimmung ist bis auf die taxonomische Ebene von Spezies manchmal sogar Subspezies möglich. Die Peaks der unbekannten Proben werden mit den Peaks eines Datenbank-Stamms verglichen. Es wird in Abbildung 10 zwischen exakten Übereinstimmungen (grün), annähernder Übereinstimmung (gelb) und fehlender Übereinstimmung (rot) unterschieden.

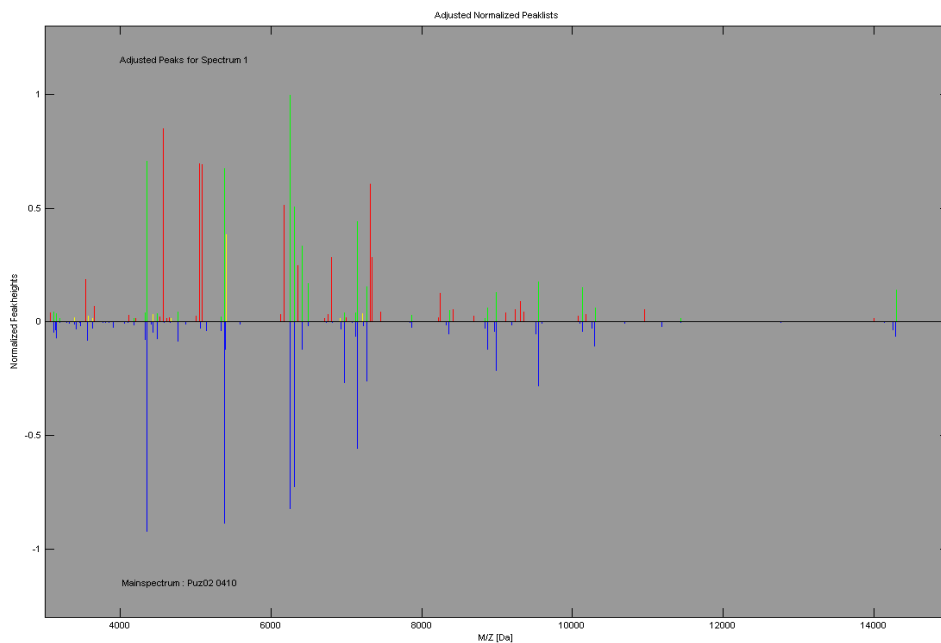


Abbildung 10: Vergleich der Peaks

Im oberen Bereich ist das Spektrum einer unbekannten Probe, die identifiziert werden soll. Der untere Abschnitt zeigt in blauer Farbe die Peaks eines Referenzstamms der Datenbank. Durch Vergleich der beiden Spektren wurden grün Peaks für exakte Übereinstimmungen dargestellt, gelb annähernder Übereinstimmung und rot fehlender Übereinstimmung.

Die Parameter für die Identifizierung sind in einer MSP Score Tabelle aufgelistet. Hier werden die Bedeutungen der einzelnen Parameter erklärt (Tab. 7).

Tabelle 7: Verschiedene Parameter der Ergebnisse der Identifizierung

Parameter	Bedeutungen
Detected Species	Species, deren Spektren im Vergleich zum Spektrum der zu identifizierenden Proben angewendet wird
ID-Code	ID Code von der MSP
Act. Sc.	„Actual score“ stellt die erreichte Punktzahl des unbekannten Spektrums dar
Max. Sc.	„Maximum Score“ ist die Höchstpunktzahl des zugeordneten MSP
Rel. Sc.	Relative Score wird durch den Quotienten aus „Act Sc“ und „Max Sc“ (maximal = 1) definiert. Dieser Wert zeigt, wie viel Prozent der Peaks des verglichenen MSP mit Peaks der unbekannten Spezies überstimmen
PN k	Stellt die Zahl der grünen Peaks dar, die mit dem Referenzkeim exakt im Grafikfenster erscheinen
PN b	Es listet die annähernd überstimmenden Peaks auf, die im Grafikfenster gelb entsprechen
PN m	Zeigt die roten Peaks auf, die mit dem Referenzkeim überhaupt nicht überstimmen
Rel. P-Num	Relative Peak number ist das Ergebnis der Gleichung $PN\ k + (0,5 \times PN\ b) / PN\ m$. Der Parameter illustriert, wieviel Prozent der unbekannten Peaks mit denen MSP übereinstimmen.
I-Corr.	I-Korrelationswert ist ein Maß zwischen der Intensitäts-Symmetrie von den übereinstimmenden Peaks
Overall Score	Dies ist die maximale Punktzahl nach der Gleichung $Rel\ Score \times Rel\ P-Num. \times I-Corr. \times 1000$
Log (Score)	Logarithmic Score von Overall Score

Im Anschluss werden die Ergebnisse des Datenbank-Vergleichs in einem Report (Tab. 8) zusammengefasst. Der Score Value ist der oben genannte Log (score), der Aufschluss über die Validität der Differenzierung gibt. Das Maximum liegt bei 3. Bei Werten über 1,7 ist eine Identifizierung auf Genus Ebene erreicht, bei Wert über 2,0 kann man von einer sicheren Identifizierung auf Spezies Ebene ausgehen. Die zuoberst genannte Spezies hat mit der unbekannten Probe die größte Ähnlichkeit. Es können das beste Ergebnis und noch weitere 9 Ergebnisse dargestellt werden, um die Plausibilität zu kontrollieren.

Tabelle 8: Der Report der Identifizierungsergebnisse von *Bacillus cereus*-Isolaten

Rank(Quality)	Matched Pattern	ScoreValue	NCBIIdentifier
1(+++)	<i>Bacillus cereus</i> DSM 31_DSM	2.309	1396
2(++)	<i>Bacillus mycoides</i> DSM 2048_DSM	2.016	1405
3(+)	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> DSM 11821_DSM	1.924	86662
4(+)	<i>Bacillus thuringiensis</i> DSM 2046_DSM	1.846	1428
5(+)	<i>Bacillus pseudomycolides</i> DSM 12442_DSM	1.751	64104
6(-)	<i>Bacteroides suis</i> DSM 20612_DSM	1.666	384637
7(-)	<i>Saccharothrix mutabilis</i> ssp. <i>mutabilis</i> HKI 9771 HKJ	1.405	33921
8(-)	<i>Clostridium chauvoei</i> 1024_NCTC 8596_BOG	1.343	46867
9(-)	<i>Alishewanella fetalis</i> DSM 16032 HAM	1.278	111143
10(-)	<i>Starkeya novella</i> B516_DSM 506 UFL	1.277	921

Die generierten MSP konnten untereinander verglichen werden. Um die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen Spezies zu erklären, ermöglicht die BioTyper Software eine vollautomatisch klassifizierende Gruppierung der ausgewählten Stämme in Dendogrammen. Darin werden zwischen den Spektren bestehende Unterschieds- bzw. Ähnlichkeitsbeziehungen grafisch dargestellt. Diese Dendrogramme können für verschiedene Spezies erstellt werden.

3 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse von Einsatzmöglichkeiten der MALDI-TOF Technik zur Analyse von Mischkulturen in natürlichen bakteriellen Gemeinschaften vorgestellt.

Zuerst werden die Ergebnisse der MALDI-Analyse mit den Wasserproben aus dem Westerhöfer Bach gezeigt. Im Rahmen dieser Arbeiten wurden zunächst 92 Flavobakterien-Isolate (40 *Flavobacterium*-Typstämme und 52 Isolate) im MALDI-TOF MS gemessen und die entsprechenden Stammbäume erzeugt, welche dann mit dem 16S rRNA Gensequenz Stammbaum verglichen wurden. Im zweiten Teil wurden 9 Mischungen von Ribosomen mittels MALDI-Technik qualitativ und quantitativ differenziert. Des weiteren wurden die Einflüsse von Nährmedien untersucht und interessante Peaks mit MALDI TOF/TOF MS sequenziert. Zum Bestimmen der Anwendungsbereiche wurde diese MALDI-Methode direkt bei vier im Labor hergestellten Mischkulturen von definierten Bakterienstämmen eingesetzt. Als letzter Teil wurden drei Umweltproben unmittelbar mit der MALDI-Methode untersucht und die bakterielle Zusammensetzung ermittelt. Dafür wurde eine Datenbank von 142 Aktinomyceten-Stämmen aufgebaut. Um die Einsetzbarkeit der MALDI-TOF Technik festzustellen, wurden die Proben gleichzeitig mit einer kultivierungsabhängigen Methode und DGGE untersucht. Dabei wurden insgesamt 44 Isolate mittels fünf Nährmedien erhalten und mit morphologischen, chemotaxonomischen, molekularbiologischen und der MALDI-Methode identifiziert.

3.1 Direkte Analyse der Wasserprobe aus dem Westerhöfer Bach

80 L Wasser aus dem Westerhöfer Bach wurden wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben vorbereitet. Die Wasserprobe, der Überstand und Pellets aus der Milchzentrifuge wurden extrahiert und direkt im MALDI-TOF Massenspektrometer analysiert.

Einerseits war es schwer, Spektren von guter Qualität aus den Proben zu gewinnen, andererseits waren die erhaltenen Spektren nicht reproduzierbar, da die Peakmassen und -intensitäten sehr variierten. Trotzdem wurden die erzeugten Spektren mit der BioTyper 2.0 Software gegen die Bruker Referenzdatenbank identifiziert, welche 3370 Spektren enthält. Die Proben wurden als Spezies von Gattungen *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Pseudomonas* und *Burkholderia* identifiziert.

In einer früheren Arbeit wurden Flavobakterien als dominante Bakterien-Isolate im

Westerhöfer Bach beschrieben (Brambilla *et al.*, 2007), welche aber nicht in der direkten MALDI-Analyse detektiert wurden. Der Vergleich der Ergebnisse aus der direkten MALDI-TOF Analyse und den kultivierungsabhängigen Untersuchungen zeigte selten Übereinstimmungen. Daraus folgt, dass die MALDI Ergebnisse der direkten Untersuchungen nicht aussagekräftig waren.

3.2 Phylogenetische Relevanz von MALDI-TOF Spektren für die Gattung: *Flavobacterium*

Um zu ermitteln, welche Probleme bei der Analyse die Bakterien aus den Wasserproben mittels MALDI Analysen auftreten, wurden 40 *Flavobacterium*-Typstämme und 52 Isolate aus dem Westerhöfer Bach mittels MALDI-TOF MS bzgl. ihres m/z -Wertes charakterisiert. Bei der MALDI-Messung wurde der Zellextrakt mit einer Matrix vermischt, damit Proteine in Größe von 2.000 – 20.000 Da ionisiert und nach ihrer Masse getrennt werden konnten. Insgesamt wurden 1472 Massenspektren ermittelt, woraus 92 „main spectra“ hergestellt wurden.

Zuerst sollten die Proteinmuster von Flavobakterien-Typstämmen mit MALDI-TOF MS dargestellt werden. Die 40 *Flavobacterium* Spezies wurden kultiviert, die geerntete Zellmasse weiter bearbeitet, wie in 2.3.1, 2.10.2.1, 2 beschrieben. Jede Spezies ergab beim Messen 16 Fingerprint-Massenspektren. Nach der Bearbeitung in der FlexAnalysis wurden die MS-Spektren einer Spezies miteinander verglichen und gezeigt, dass die Massen reproduzierbar waren und die Peaks gute relative Intensität aufwiesen. Bei weiteren taxonomischen Analysen spielte die relative Intensität der Peaks eine wichtige Rolle, weil die Signale mit niedriger relativer Intensität als Grundrauschen nicht verarbeitet wurden.

In Abbildung 11 sind beispielhaft die Fingerprint-Massenspektren von folgenden *Flavobacterium*-Typstämmen dargestellt: *Flavobacterium aquidurense* DSM 18293^T, *Flavobacterium indicum* DSM 17447^T, *Flavobacterium johnsoniae* DSM 2064^T, *Flavobacterium limicola* DSM 15094^T und *Flavobacterium psychrophilum* DSM 3660^T.

Die 5 Spektren stellten eine Übereinstimmung dar: die Verteilung der Peaks ähnelte sich zueinander im Massenbereich von 2.200 bis 12.000 Da und verschiedene Spezies außer *Flavobacterium indicum* hatten eine ähnliche Signalintensität.

Des weiteren wurden 52 Isolate aus dem Westerhöfer Bach für die MALDI-Analysen ausgewählt, die mit molekularbiologischen Methoden schon untersucht wurden. Die Kultivierung, Analysen und Auswertungen der Isolate erfolgten unter gleichen Behandlungen

wie die den *Flavobacterium*-Typstämme.

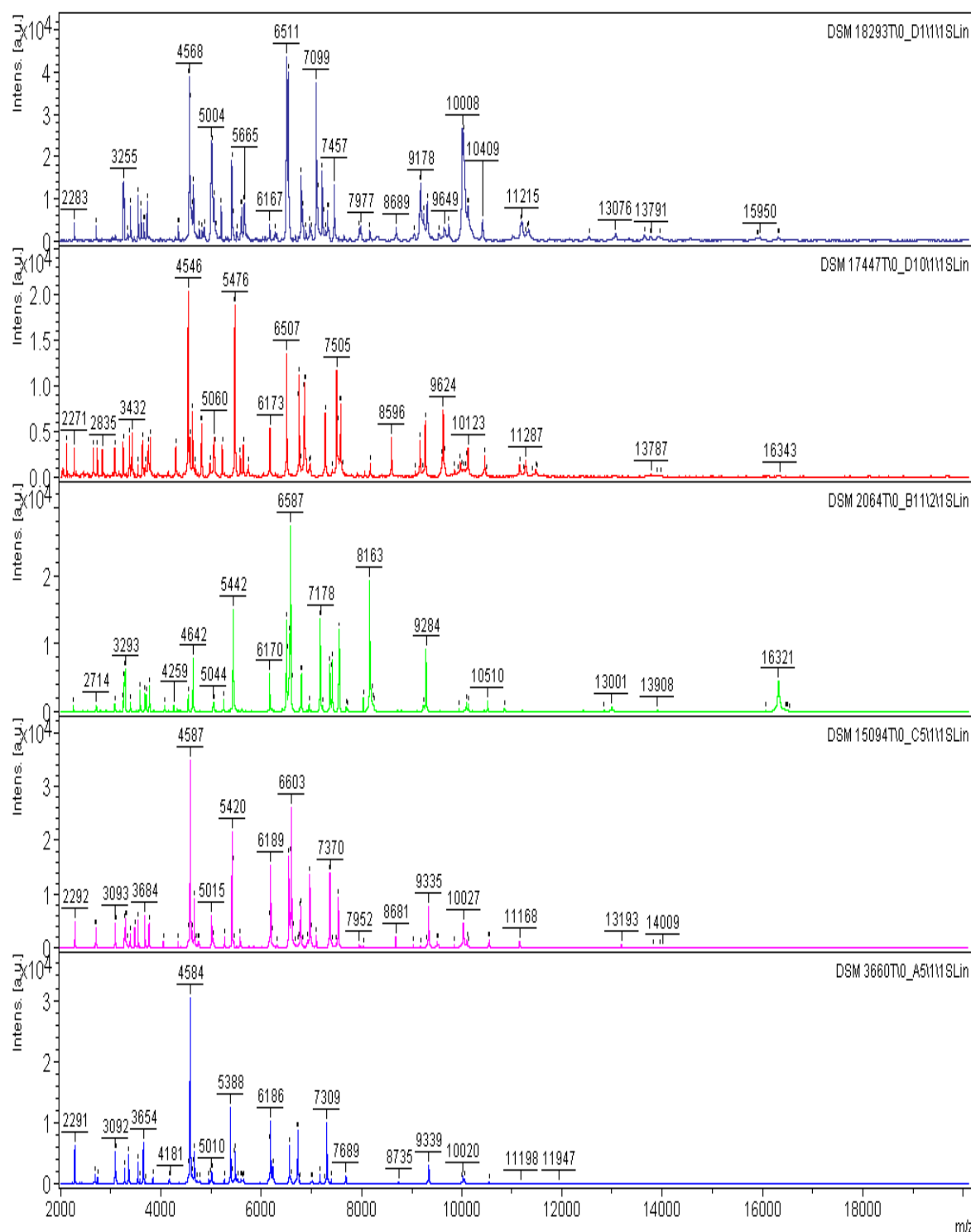


Abbildung 11: Spektren von *Flavobacterium*-Typstämmen

Diese Typstämme wurden auf R2A Agarplatten bei 28°C für 2 - 4 Tage inkubiert. Die Zellextrakte wurden mit Matrix α -Cyano-4-hydroxizimtsäure gemischt und bei der MALDI-Messung positive-Ionen Massenspektrum erhalten. Von oben nach unten sind die Fingerprint-Massenspektren von *Flavobacterium aquidurens* DSM 18293^T, *Flavobacterium indicum* DSM 17447^T, *Flavobacterium johnsoniae* DSM2064^T, *Flavobacterium limicola* DSM 15094^T und *Flavobacterium psychrophilum* DSM 3660^T.

Die Fingerprint-Massenspektren wurden in die BioTyper Software eingelesen und für jeden Stamm ein „main spectrum“ hergestellt, welches auf allen Spektren einer Spezies basierte. Die Signale, die bei mindestens 60% der Spektren vorhanden waren, wurden in einem „main spectrum“ gesammelt. Deswegen bestand das „main spectrum“ aus den spezifischen Signalen von Gattungs- und Speziesebene und konnte als Referenz zu taxonomischen Analysen dienen. Durch Vergleich der „main spectra“ wurden die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen Spezies in Stammbäumen bestimmt.

Abbildung 12a stellte ein Teil des in BioTyper erstellten Dendrogramms, welches 40 Flavobakterien-Typstämme und 52 Isolate beinhaltete dar. Die Isolate gruppieren sich um die Typstämme, da die spezifischen Peaks eine Differenzierung zwischen Flavobakterien-Spezies ermöglichen. Aufgrund der mehr als 80% Übereinstimmung wurden 10 Isolate und WB 2.4-7

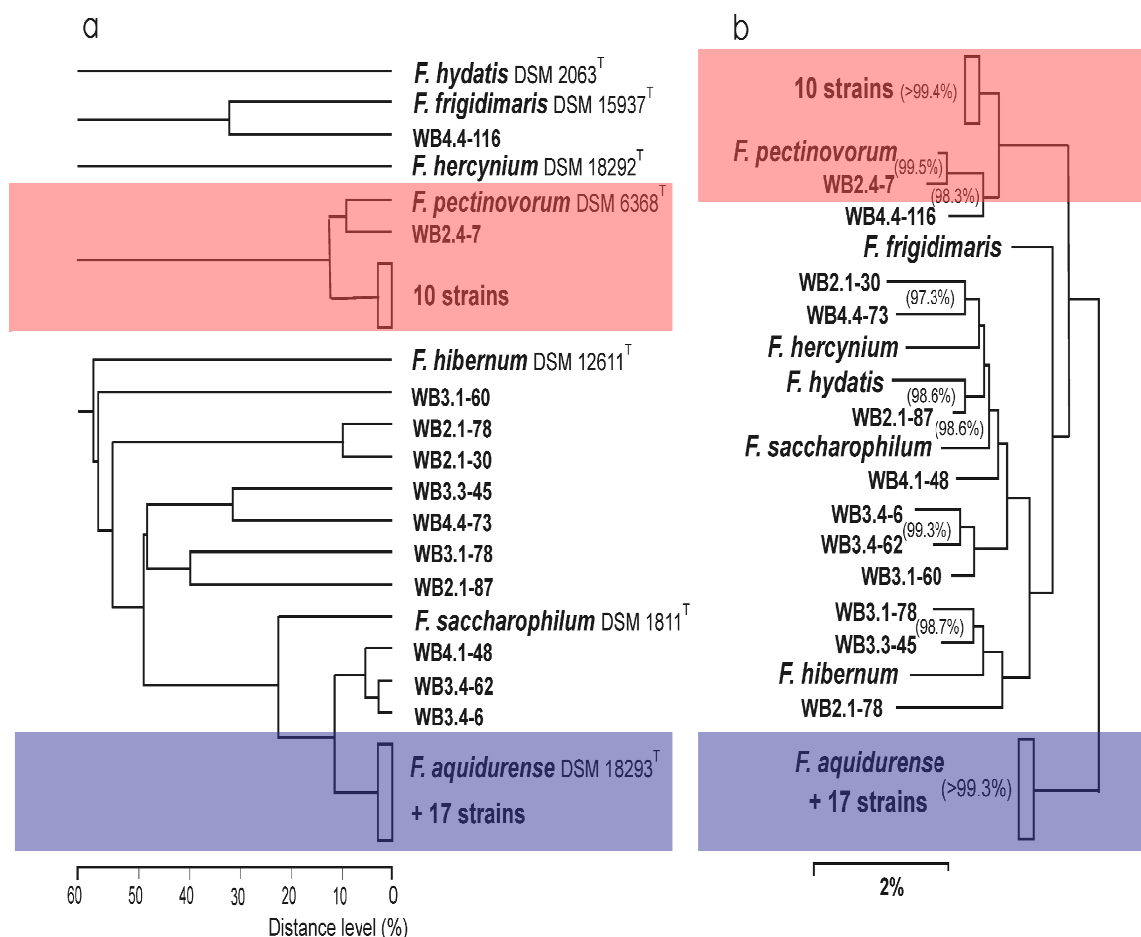


Abbildung 12: Dendrogramm von MALDI und 16S rRNA-Gensequenzen

a ist ein Teil des Dendrogramms von MALDI „main spectra“. Anhand der MALDI-Spektren wurden die „main spectra“ in BioTyper hergestellt und zum Stammbaum berechnet. b ist ein 16S rRNA Gensequenz Stammbaum, der mit Neighbor-joining berechnet wurde.

der Species *F. pectinovorum* zugeordnet (Abb. 12a, rot markiert). Zugleich bildeten *F. aquidurens* und die anderen 17 Isolate ein Cluster, in dem alle Stämme eine Ähnlichkeit bis zu ca. 95% zueinander besaßen (Abb. 12a, blau markiert).

Ein 16S rRNA Teil-Gensequenzen Stammbaum von den gleichen Stämmen ist in Abbildung 12b illustriert. Darin wurden die Isolate zu denselben Typstämmen wie im Stammbaum der MALDI-Spektren klassifiziert, bis auf WB 2.1-30, WB 2.1-87 und WB 4.4-73. Im Vergleich zum MALDI Stammbaum, hatte die Gruppe von *F. pectinovorum* auf der Genom-Ebene miteinander anstatt 20% weniger als 2% Abweichung. Die Mitglieder der *F. aquidurens* Cluster wiesen untereinander mehr als 99.3% Übereinstimmung auf. Das bedeutet, dass die Gruppierungen der genomisch und phänetisch sehr ähnlichen Isolate in beiden Methoden identisch waren.

Außerdem wurden vier Isolate WB 3.3-2^T, WB 3.2-61^T, WB 4.1-42^T und WB 2.3-68^T im *Flavobacterium*-Stammbaum von allen bekannten Stämmen getrennt (siehe Abb. 13). Ein Isolat WB 2.3-68^T wies eine Ähnlichkeit von ca. 65% zum *F. psychrophilum* auf und bildete ein Cluster. WB 3.2-61^T hatte 20% Abweichung mit dem Nachbar *F. johnsoniae* und gehörte zu der anderen Gruppe mit 11 Typstämmen sowie *F. denitrificans*, *F. johnsoniae*, *F. defluvii*, *F. hydatis* usw., welche zueinander 60% ähnlich waren. Im Gegensatz dazu war WB 3.3-2^T von dieser Gruppe weiter entfernt. Die große Distanz zwischen WB 4.1-42^T und allen anderen Mitgliedern der Gattung *Flavobacterium* wurde auch im Stammbaum dargestellt. Mit Hilfe von dieser Analyse und anderen taxonomischen Verfahren wurden vier Isolate als neue Spezies *Flavobacterium rivuli* (WB 3.3-2^T), *F. subsaxonicum* (WB 4.1-42^T), *F. swingsii* (WB 2.3-68^T) und *F. reichenbachii* (WB 3.2-61^T) klassifiziert (Ali *et al.*, 2009).

Die zwei Stammbäume zeigen, dass *Flavobacterium*-Isolate aus dem Westerhöfer Bach mittels MALDI-Technik richtig klassifiziert werden konnten.

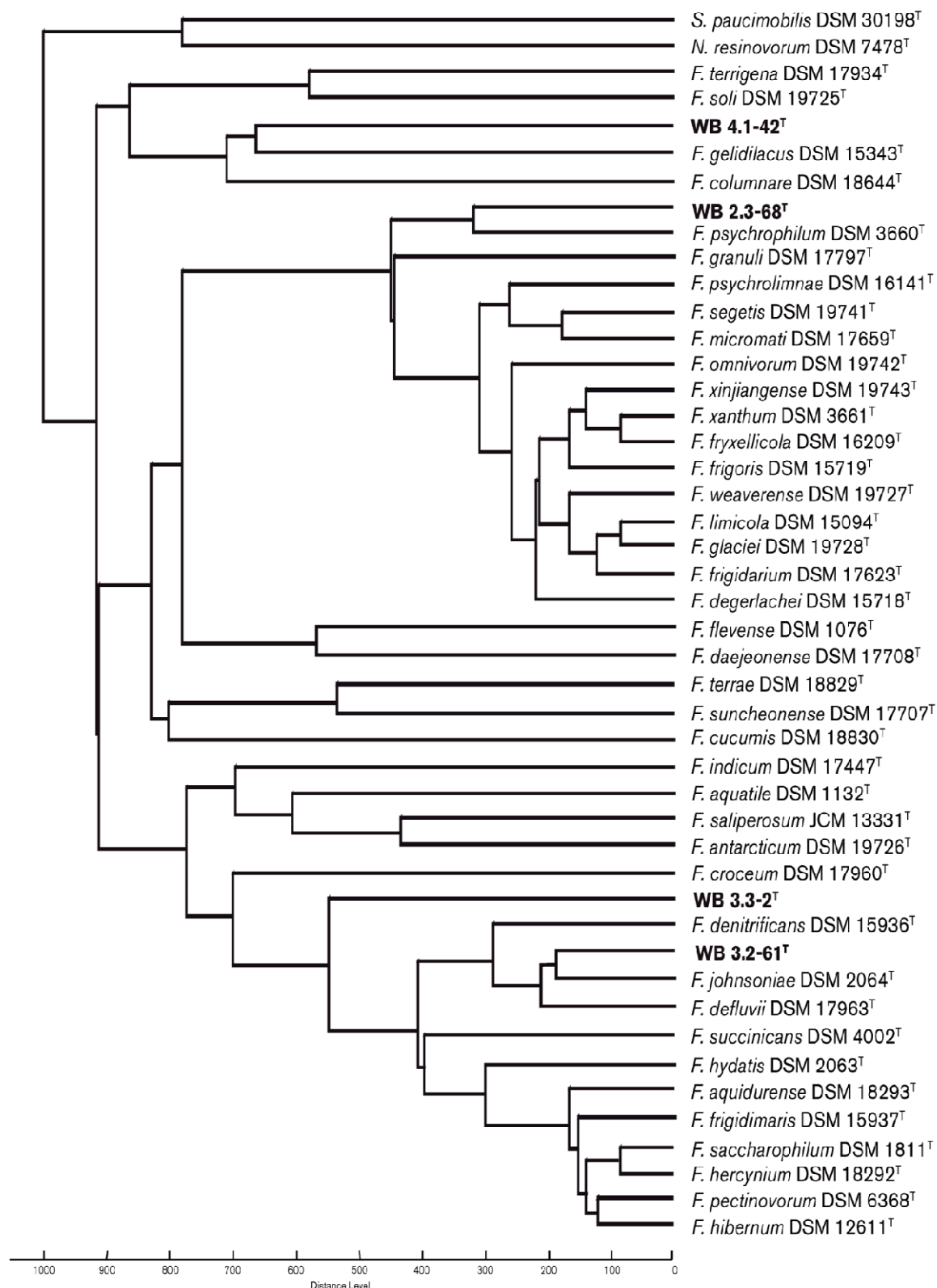


Abbildung 13: Dendrogramm der „main spectra“ von *Flavobacterium*

40 *Flavobacterium*-Typstämme und vier Isolate wurden in MALDI-TOF MS gemessen, „main spectra“ erzeugt und verglichen. Die Position der vier Isolate wurde fett gedruckt. *Sphingomonas paucimobilis* DSM 30198^T und *Novosphingobium resinovorum* DSM 7478^T dienen als Fremdgruppen.

3.3 Differenzierungen der Mischkultur

Die Fragestellung ist hierbei, ob sich die bakteriellen Gemeinschaften mit der MALDI-TOF Methode charakterisieren lassen und bei bis zu wie vielen Bakterien in einer Mischkultur eine klare Aussage geliefert werden kann.

Beim ersten Versuch wurde die Rolle von Ribosomen in MALDI Messung bestimmt. Als zweiter Versuch wurden die Mischungen, die von isolierten Ribosomen zweier Stämmen *E. coli* und *Flavobacterium psychrophilum* hergestellt wurden, qualitativ und quantitativ analysiert. Im Anschluss wurden verschiedene Mischkulturen aus definierten Bakterienzellen bzw. Zellkomponenten hergestellt und mit der MALDI-Methode differenziert, um die Einsatzmöglichkeiten sowie die Grenzen dieser Methode zu ermitteln.

3.3.1 Vergleich von *Escherichia coli* Extrakten

Zuerst war zu untersuchen, ob die meisten Peaks im Spektrum des Extraktes von ribosomalen Proteinen geliefert werden. Dafür wurde *Escherichia coli* ausgewählt, da dieser Stamm häufig mit MALDI-Methoden untersucht wurde. *E. coli* ist ein Gram-negatives, sporenloses Stäbchen, das aufgrund einer peritrichen Begeißelung beweglich ist.

Die isolierten Ribosomen aus *E. coli* (siehe 2.4.2) und der Extrakt von Ribosomen sowie der Zellextrakt wurden mit MALDI-TOF MS analysiert. Da die Spektren von Ribosomen und von den Extrakten der Ribosomen kaum Unterschied gezeigt hatten, wurden in folgenden Versuchen nur die Ribosomen berücksichtigt.

Der Messungen wurden mit 20 keV Beschleunigungsenergie durchgeführt und die gewonnenen Spektren in Abbildung 14 gezeigt: oben ist das Spektrum des Zellextraktes, unten die isolierten Ribosomen.

In diesen Spektren konzentrierten sich die Peaks im Bereich von 2.000 bis 12.000 Da, weil mehr Energie für die Entdeckung anderer größerer ribosomaler Proteine gebraucht wurde. Sowohl Peaksintensitäten als auch Verteilung der Peaks zeigten bei den beiden Spektren große Übereinstimmungen mit vielen gemeinsame Peaks, besonders die für die Kalibrierung verantwortlichen Peaks sowie 4364 Da, 5380 Da, 6254 Da, 7157 Da, 7272 Da, 8367 Da und 10298 Da.

Der Unterschied zwischen den beiden lag darin, dass das Spektrum des Zellextraktes mehr Peaks als das andere beinhaltete. Beim Vergleich wurden die Peaks mit sehr niedriger relativer Intensität nicht berechnet, weil die Signale mehr zu dem Grundrauschen der Basislinie gehörten.

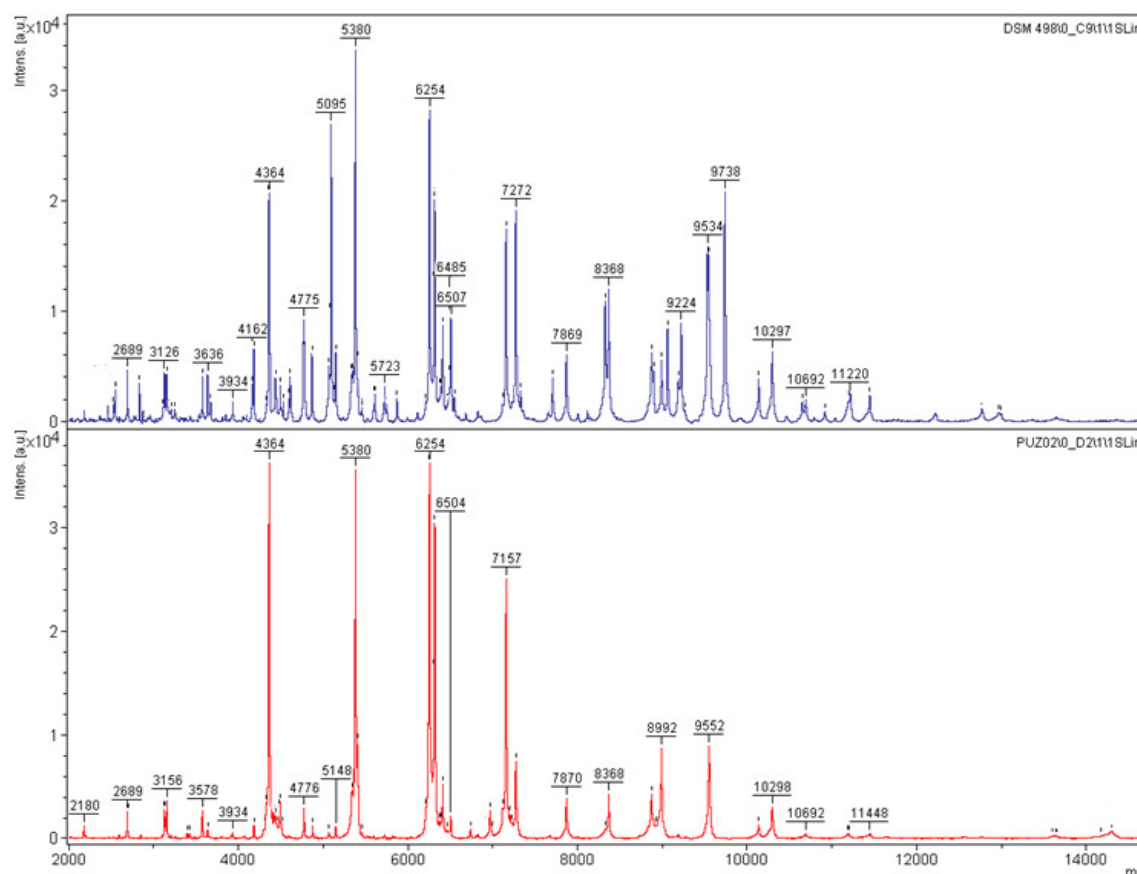


Abbildung 14: Vergleich der Spektren von Extraktion und Ribosomen

Positive-Ionen Massenspektrum unter Verwendung von α -Cyano-4-hydroxymizsäure Matrix. Das obere Spektrum ist der Extrakt der *E. coli* Zelle, und das untere die isolierten Ribosomen von *E. coli*.

Die Peakmassen der beiden Spektren wurden mit Sequenzdaten von *E. coli* (DSM 498) verglichen und in Tabelle 9 aufgelistet. Die Sequenzmassen von ribosomalen Proteinen wurden aus der NCBI GenDatenbank heruntergeladen. Während der MALDI-Messungen wurden manche Proteine modifiziert und deren Sequenzmassen in der Tabelle umgerechnet.

Tabelle 9: Vergleich der Peakmassen in Sequenzdaten und Experimentdaten (Peaks in den Spektren von *E. coli* Extrakt und isolierten Ribosomen)

Protein	Sequenzen Massen (Da)	Experimenten Massen (Da)		Methionine lost?	Kommentar
		Zellextraktion	Ribosomen		
L36 ²⁺	2181,16	-	2180,46	Nein	-
S22 ²⁺	2546,9	2546,10	-	Nein	-
L34 ²⁺	2689,19	2688,83	2688,75	Nein	-
-	-	2833,85	-	-	-
L33 ^{2+*} m	3120,12	3126,11	3126,12	Ja	methyliert
L32 ^{2+*}	3156,6	3155,99	3156,19	Ja	-
L35 ^{2+*}	3577,9	3577,93	3577,65	Ja	-
L29 ²⁺	3635,71	3635,64	3635,31	Nein	-
L31 ²⁺	3934,5	3933,64	3933,70	Nein	-

-	-	4161,69	-	-	-
S21 ^{2+*}	4183,4	4183,06	4182,88	Ja	-
-	-	4332,61	4332,07	-	-
L36 ⁺	4364,3	4363,74	4364,11	Nein	-
L28 ^{2+*}	4436,65	4436,79	4436,80	Ja	-
S18 ^{2+*} a	4426,65	4446,54	4444,17	Ja	acetyliert
L27 ^{2+*}	4495,65	4495,34	4495,04	Ja	-
S16 ²⁺	4594,26	4594,56	-	Nein	-
-	-	4611,66	-	-	-
-	-	4767,08	-	-	-
S20 ^{2+*} , L26 ^{2+*}	4775,6	4775,15	4775,56	Ja	-
-	-	4868,32	-	-	-
S15 ^{2+*}	-	5067,62	5066,07	Ja	-
-	-	5080,74	-	-	-
S22 ⁺	5095,8	5095,30	-	Nein	-
S19 ^{2+*}	5148,55	5148,30	5148,13	Ja	-
L25 ²⁺	5345,71	5343,58	5341,60	Nein	-
L34 ⁺	5380,37	5380,10	5380,20	Nein	-
-	-	5407,21	5407,52	-	-
-	-	5609,94	-	-	-
S14 ^{2+*}	-	5723,40	-	Ja	-
-	-	5870,40	-	-	-
-	-	6211,85	6213,25	-	-
-	-	-	6240,78	-	-
L33 ⁺ * m	6240,46	6253,89	6254,07	Ja	methyliert
-	-	6298,02	6299,46	-	-
L32 ⁺ *	6315,26	6314,48	6314,70	Ja	-
-	-	6368,92	6367,72	-	-
L18 ²⁺	6383,85	6384,48	6384,12	Nein	-
L30 ⁺ *	6410,67	6410,03	6410,21	Ja	-
S13 ^{2+*}	6483,15	6484,91	-	Ja	-
L19 ²⁺	6501,05	6506,53	6503,78	Nein	-
-	-	6547,16	-	-	-
L31 frag ⁺	6971,08	-	6969,61	Nein	c-term modifiziert
-	-	7117,61	7116,55	-	-
L35 ⁺ *	7157,90	7156,95	7157,29	Ja	-
-	-	7231,66	-	-	-
L29 ⁺	7273,42	7272,46	7272,95	Nein	-
-	-	7331,12	-	-	-
-	-	7705,46	-	-	-
L31 ⁺	7871,10	7869,35	7869,96	Nein	-
-	-	8324,35	-	-	-
S21 ⁺ *	8368,76	8367,56	8367,63	Ja	-
L28 ⁺ *	8875,00	8874,22	8874,23	Ja	-
S18 ⁺ *a	8855,3	8895,05	-	Ja	acetyliert
L27 ⁺ *	8993,5	8991,85	8991,93	Ja	-
-	-	9061,72	-	-	-
S16 ⁺	9190,52	9189,36	-	Nein	-

-	-	9223,94	-	-	-
-	-	9533,73	-	-	-
S20 ⁺ *, L26 ⁺ *	9553,2	9550,82	9551,80	Ja	-
-	-	9737,52	-	-	-
S15 ⁺ *	10137,6	10136,13	10136,40	Ja	-
S19 ⁺ *	10299,1	10297,34	10297,64	Ja	-
-	-	10649,13	-	-	-
L25 ⁺	10693,5	10691,83	10691,67	Nein	-
L24 ⁺ *	11185,1	-	11185,03	Ja	-
L23 ⁺	11199,2	11197,83	11196,51	Nein	-
-	-	11219,70	-	-	-
S14 ⁺ *	11449,3	11447,76	11447,77	Ja	-

Peaks von ribosomalen Proteinen, die in beiden Spektren vorhanden waren und der anhand der Gensequenzen errechneten Masse entsprachen, wurden rot markiert. Wiedergefundene Peaks in beiden Spektren, die nicht aus Ribosomen vorgekommen waren, wurden blau markiert. ⁺: einfach beladene Ionen; 2⁺: zweifach geladene Ionen; a: acetyliert; frag: fragmentiert; m: methyliert; *: Die Sequenzmasse wurde berechnet, indem Methionin auf dem N-terminalen von Protein verloren gegangen war. In dieser Tabelle wurden die Peaks mit einer Intensität von größer als 0,04 aufgelistet.

Die häufigste Modifikation bei den Messungen umfasst den Verlust von Methionin auf dem N-terminalen Ende des Proteins, der zu einer Differenz von 132 Da zwischen den Sequenz- und Experimentmassen geführt hat (Sherman *et al.*, 1985). Das Methionin wird immer abgespalten, wenn Alanin, Glycin, Leucin, Prolin, Valin, Serin und Threonin auf dem vorletzten Platz waren. Es gab auch andere Modifikationen, bei denen L33⁺, L33²⁺ methyliert, und S18⁺, S18²⁺ acetyliert wurden. Weiterhin wurden zwei Peaks von L31 beobachtet: Ein Peak war das vollständige Protein mit einer Masse von 7871,1 Da, und das andere mit 6971,1 Da entsprach einem Fragment von L31.

Im Spektrum des Zellextraktes waren 65 Peaks vorhanden, davon wurden 40 (61,5%) hinsichtlich der Masse als einfach oder zweifach beladene ribosomale Proteine charakterisiert. Diese Peaks spielten bei der Klassifizierung der Bakterien mit der BioTyper Software eine wichtige Rolle. Das Spektrum von Ribosomen hatte 43 Peaks und 36 davon (83,7%) waren ribosomale Proteine. Die beiden Spektren besaßen 39 gemeinsame Peaks, 33 Peaks davon stammten aus den Ribosomen. S22²⁺, S22⁺, S16²⁺, S16⁺, S14²⁺, S13²⁺, S18⁺ traten nur im Spektrum des Zellextraktes auf, während L36⁺, L31 frag⁺ und L24⁺ in Ribosomen gefunden wurden. Bei den anderen 6 übereinstimmten Peaks handelte es sich vermutlich um Ribosomen-assoziierte Proteine.

Der Vergleich zeigte, dass die Ribosomen 60% der entscheidenden Signale (39/65) von Zellextrakten liefern. Deswegen wurden die Mischkulturen auf der Ribosomen-Ebene hergestellt und für die MALDI-TOF Analyse verwendet.

3.3.2 Qualitative und quantitative Untersuchungen

Zwei Stämme *Escherichia coli* und *Flavobacterium psychrophilum* wurden für diese Analyse ausgewählt, weil die beiden Bakterien vollständig sequenziert wurden. Nach der Kultivierung wurden Ribosomen von diesen Stämmen isoliert (siehe 2.4.2), die Proteinmengen von Ribosomen nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt (siehe 2.5.1), die isolierten Ribosomen in verschiedenen Verhältnissen gemischt und im MALDI-TOF Massenspektrometer analysiert (siehe 2.5.2). In Abbildung 15 wurden die MS-Spektren von Ribosomen der *F. psychrophilum* (a), Mischungen der Ribosomen von *E. coli* und *F. psychrophilum* in Verhältnissen 1:1 (b1), 1:2 (b2) und 2:1 (b3) dargestellt.

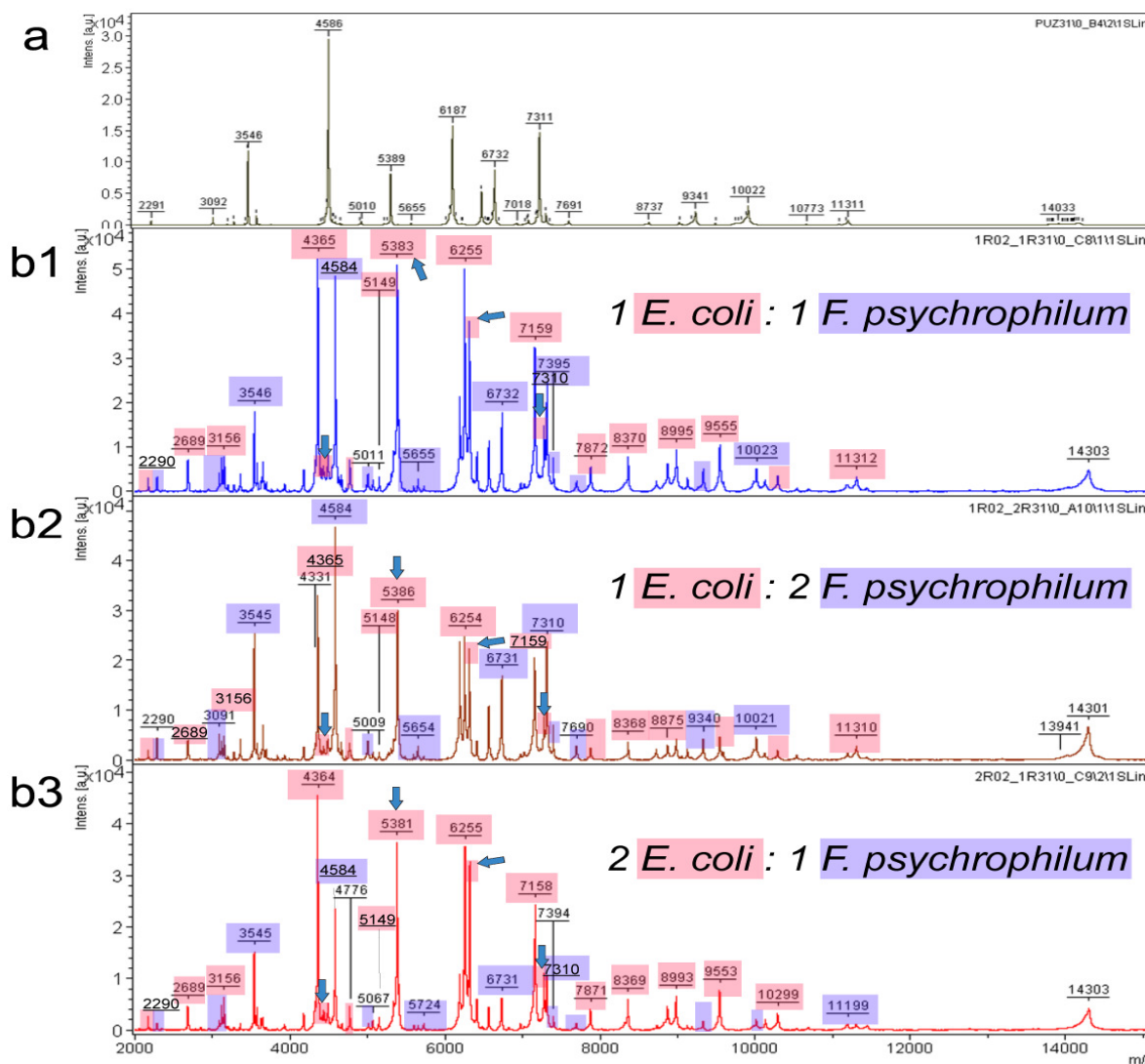


Abbildung 15: MS-Spektren von Ribosomen und drei Mischungen

a) Fingerprint Spektrum von Ribosomen der *F. psychrophilum* b) Spektren von Mischungen der Ribosomen: die Ribosomen von *E. coli* und *F. psychrophilum* wurden entsprechend der Proteinmengen gemischt und mit MALDI-Methode gemessen. b1) Mischung von 1 *E. coli* : 1 *F. psychrophilum*; b2) Mischung von 1 *E. coli* : 2 *F. psychrophilum*; b3) Mischung von 2 *E. coli* : 1 *F. psychrophilum*. Peaks von *E. coli* wurden rot markiert, Peaks von *F. psychrophilum* blau. Der Pfeil bezieht sich auf die überlagernden Peaks aus beiden Stämmen.

Die Referenzspektren in der aktuellen Datenbank werden durch das Messen von Zellextrakten von Reinkulturen erhalten, deshalb steht keine Datenbank für die Ribosomen-Spektren zur Verfügung. Für die Auswertung wurden die Spektren der Mischungen mit den jeweiligen Reinkulturen verglichen und die Peaks gemäß den betreffenden Mikroorganismen eingeordnet.

Die Spektren der Mischungen in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen ähnelten sich stark. Bei allen drei Spektren konnte eine Vielzahl von Peaks aus zwei Bakterien detektiert werden. Im Spektrum b1 gab es 68 Peaks: 33 davon (48,53%) gehörten zu *E. coli*, 31 davon (45,59%) zu *F. psychrophilum* und die weiteren vier Peaks von 4485,11 Da, 5382,57 Da, 6316,10 Da und 7275,01 Da waren überlagernde Peaks. Davon stammten 28 bzw. 25 Peaks aus ribosomalen Proteinen. Die anderen zwei Spektren b2, b3 hatten 67 bzw. 64 Peaks.

Beim Vergleich der drei Spektren von Mischungen war ein Unterschied bei dem überlagernden Peak von 5382,57 Da zu erkennen, der aus dem Peak bei der Masse 5380,20 Da von *E. coli* und 5389,39 Da von *F. psychrophilum* vorkam. Im Spektrum b2 war die Peakmasse bei 53885,52 Da, während in b3 5380,66 Da. Es wurde vermutet, dass die Änderungen der Masse durch die verschiedenen Mischungsverhältnisse hervorgerufen wurden. Obwohl die Menge von Peaks und einigen Peakintensitäten in den Spektren variierten, blieben die wichtigen Peaks der ribosomalen Proteine gleich. Aufgrund von solchen einzigartigen Peaks waren die beiden Bakterien in den Mischung mit der MALDI-Methode nachweisbar.

Obwohl die Menge der jeweiligen ribosomalen Proteine in Bakterien gleich war, wurden die Proteine bei der Messung mit unterschiedlichen Peaksintensitäten bezeichnet. Für die quantitative Analyse wurden vier Peaks von ribosomalen Proteinen der jeweiligen Bakterien ausgewählt: L36⁺, L35⁺*, L33⁺*m und S19²⁺*. Mit den Intensitäten der wichtigsten Peaks in den "main spectra" wurden die MALDI-Verhältnisse berechnet und mit den Mischungsverhältnissen verglichen. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 10 aufgelistet.

Das MALDI-Verhältnis von L35⁺*-Peaks war in der 1:1 Mischung 1: 0,628, während bei der 2:1 Mischung 1: 0,314. Das zeigte, dass die Peaksintensitäten im Zusammenhang mit den Mischungsverhältnissen standen. Diese signifikante Korrelation war in der 1: 2 Mischung nicht vorhanden. Bei anderen Peaks traten die MALDI-Verhältnisse unabhängig von den Mischungsverhältnissen auf.

Diese Untersuchungen zeigten, dass die Mischungen von Ribosomen aus zwei Bakterien mittels MALDI-Technik qualitativ aber nicht quantitativ charakterisiert werden konnten.

Tabelle 10: Vergleich des Mischungsverhältnisses und MALDI Peaksintensitäten

Mischungsverhältnisse	Peaksintensitäten		MALDI-Verhältnisse %
	<i>E. coli</i>	<i>F. psychrophilum</i>	
	L36 ⁺ : 4364,59 Da	L36 ⁺ : 4585,17 Da	
1 : 1	0,992	0,869	1 : 0,876
1 : 2	0,627	1	1 : 1,595
1 : 0,5	0,961	0,449	1 : 0,467
	L35 ⁺ *: 7158,84 Da	L35 ⁺ *: 7311,47 Da	
1 : 1	0,583	0,366	1 : 0,628
1 : 2	0,397	0,446	1 : 1,123
1 : 0,5	0,589	0,185	1 : 0,314
	L33 ⁺ *m: 6255,44 Da	L33 ⁺ *m: 6732,09 Da	
1 : 1	0,735	0,267	1 : 0,363
1 : 2	0,454	0,326	1 : 0,718
1 : 0,5	0,655	0,121	1 : 0,282
	S19 ²⁺ *: 5149,24 Da	S19 ²⁺ *: 5010,51 Da	
1 : 1	0,047	0,062	1 : 1,319
1 : 2	0,02	0,066	1 : 3,3
1 : 0,5	0,056	0,029	1 : 0,518

3.3.3 Verschiedene Versuchsansätze

Es stellte sich die Frage, wie viele Bakterien in einer Mischkultur mit der MALDI-Methode differenziert werden konnten. Dazu wurden 6 Bakterien *E. coli*, *S. paucimobilis*, *F. aquidurens*, *A. citreus*, *P. putida* und *S. macmurdoensis* ausgewählt, die in den Wasserproben von dem Westerhöfer Bach vorhanden waren. Die Mischungen der Ribosomen wurden auf verschiedenen Weisen hergestellt.

Zuerst wurden die Bakterien extrahiert und im MALDI-TOF MS gemessen. Es musste sichergestellt werden, dass jeder Mikroorganismus mit diesen Methoden nachgewiesen werden konnte. Anschließend wurden unterschiedliche Versuchsansätze durchgeführt:

a) Die Bakterien wurden auf geeigneten Nährmedien getrennt kultiviert, die Ribosomen isoliert und deren Proteinmenge ermittelt (siehe 2.4 und 2.5). Dann wurden die erhaltenen Ribosomen vom einem einzelnen Bakterium mit MALDI-TOF MS analysiert. Einerseits wurden die Ribosomen-Spektren mit den Spektren vom Zellextrakt verglichen, um die Qualität der Ribosomen zu prüfen. Andererseits standen die Ribosomen-Spektren als Referenzspektren zur Verfügung. Danach wurden die von zwei bis zu sechs verschiedenen Bakterien erfolgreich isolierten Ribosomen entsprechend der Proteinmengen gleichmäßig und stufenweise zusammen gemischt. Für die Analyse dieser Mischungen wurde anschließend die MALDI-Methode angewandt.

b) Diese 6 Bakterien wurden in einem einheitlichen Medium bis zum gleichen OD-Wert gezüchtet. Nach dem Ernten wurden die Zellextrakte von jedem Bakterium im MALDI

gemessen. Die 6 Mikroorganismen wurden gleichmäßig zusammengemischt und die gesamten Ribosomen isoliert (siehe 2.5.4). Der Zellextrakt und die Ribosomen von der 6-Organismen-Mischung wurden im MALDI analysiert.

3.3.3.1 Mischungen der Ribosomen bis zu sechs verschiedenen Bakterien

Ribosomen-Mischung von zwei Bakterien

Die erste Mischkultur bestand aus den Ribosomen von *Escherichia coli* DSM 498 und *Sphingomonas paucimobilis* DSM 30198. Sie gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae* und *Sphingomonadaceae*. *S. paucimobilis* ist ein aerobes Gram-negatives begeißeltes Stäbchen. Die Isolierung der Ribosomen ließ sich problemlos durchführen. Bei der Messung im MALDI-TOF MS lieferte die Mischung gute und reproduzierbare Spektren.

In Abbildung 16 wurde das Massenspektrum der Ribosomen-Mischung aus *E. coli* und *S. paucimobilis* aufgezeigt. Dabei waren 49 Peaks aufgetreten. Jeder Stamm wurde durch dessen eigene Peaks nachgewiesen. Der Stamm *S. paucimobilis* war mit einem Anteil von 53,06% (26/49) dominant, während *E. coli* einen Anteil von 42,86% (21/49) stellte. Die zwei Peaks bei der Massen 6253,59 Da und 6406,15 Da bezogen sich auf überlagernde Peaks. In den nachfolgenden Spektren wurden die überlagernden Peaks mit einem Pfeil versehen.

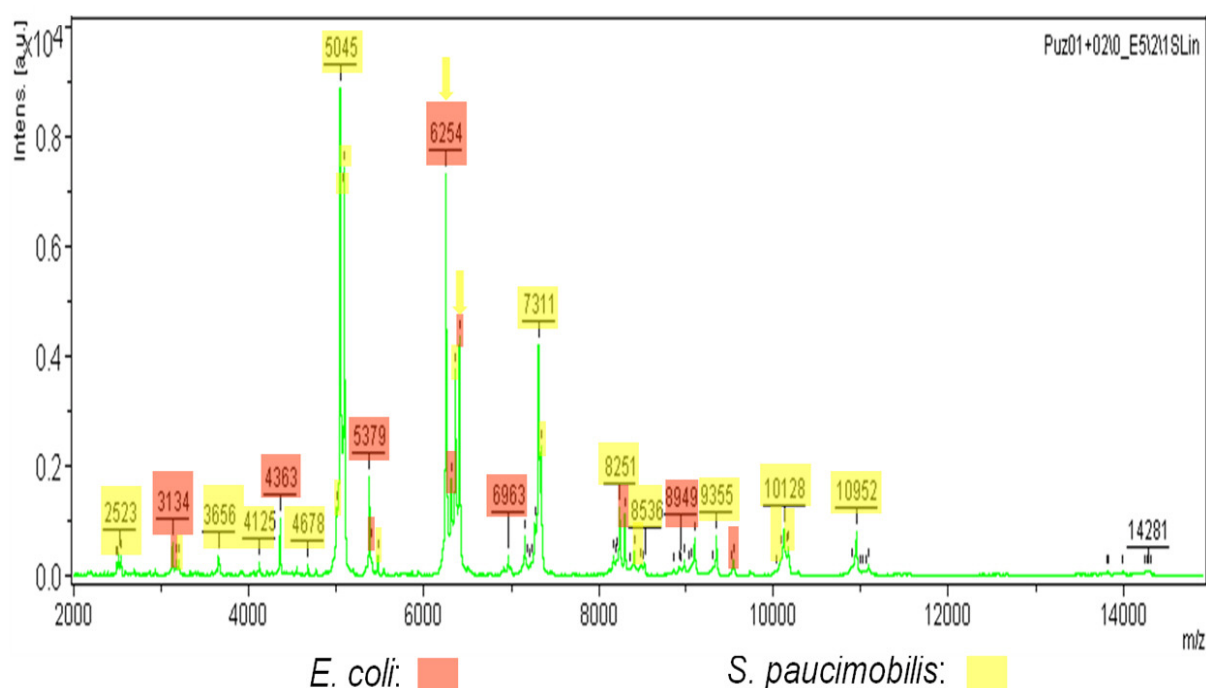


Abbildung 16: MS-Spektrum von Mischung der Ribosomen aus zwei Bakterien

Das Fringprint-Spektrum von Mischungen der Ribosomen aus *E. coli* und *S. paucimobilis*. Die Ribosomen wurden entsprechend der Proteinmengen 1:1 gemischt und mit MALDI-Methode gemessen. Die Peaks von *E. coli* sind rot markiert und die von *S. paucimobilis* gelb. Der Pfeil zeigt die überlagernden Peaks aus beiden Stämmen.

Mischung der Ribosomen aus drei Bakterien

Für diese Mischung wurde *Flavobacterium aquidurens* DSM 18293^T zu der ersten Mischkultur dazugegeben, welche im Westerhöfer Bach entdeckt wurde. *F. aquidurens* gehört zur Familie *Flavobacteriaceae* und wird als Vertreter von Gattung *Flavobacterium* ausgewählt. Es handelt sich um Gram-negative, unbewegliche, aerobe und mikroaerobe Stäbchen.

Bei einer Messung bekam die Mischung der Ribosomen aus drei Bakterien 13 ähnliche Fingerprint-Spektren mit guter Qualität. Die MS-Spektren waren somit reproduzierbar. Das Massenspektrum von dieser Mischung wurde in Abbildung 17 veranschaulicht. Das Spektrum besaß mehr Peaks (65) als das von der Mischung der zwei Bakterien (Abb. 16). *E. coli* machte einen prozentualen Anteil von 38,46% (25/65) aus, *S. paucimobilis* stellte einen von 35,38% (22/65), während *F. aquidurens* den geringsten Anteil von 23% (15/65) hatte. *E. coli* und *S. paucimobilis* besaßen gemeinsam zwei Peaks 6254,15 Da und 6407,33 Da, während *F. aquidurens* mit *S. paucimobilis* einen überlagernden Peak von 4654,96 Da aufwies. Aus dem MS-Spektrum war zu entnehmen, dass sich drei Bakterien in der Mischung mittels MALDI-Analyse voneinander unterscheiden lassen.

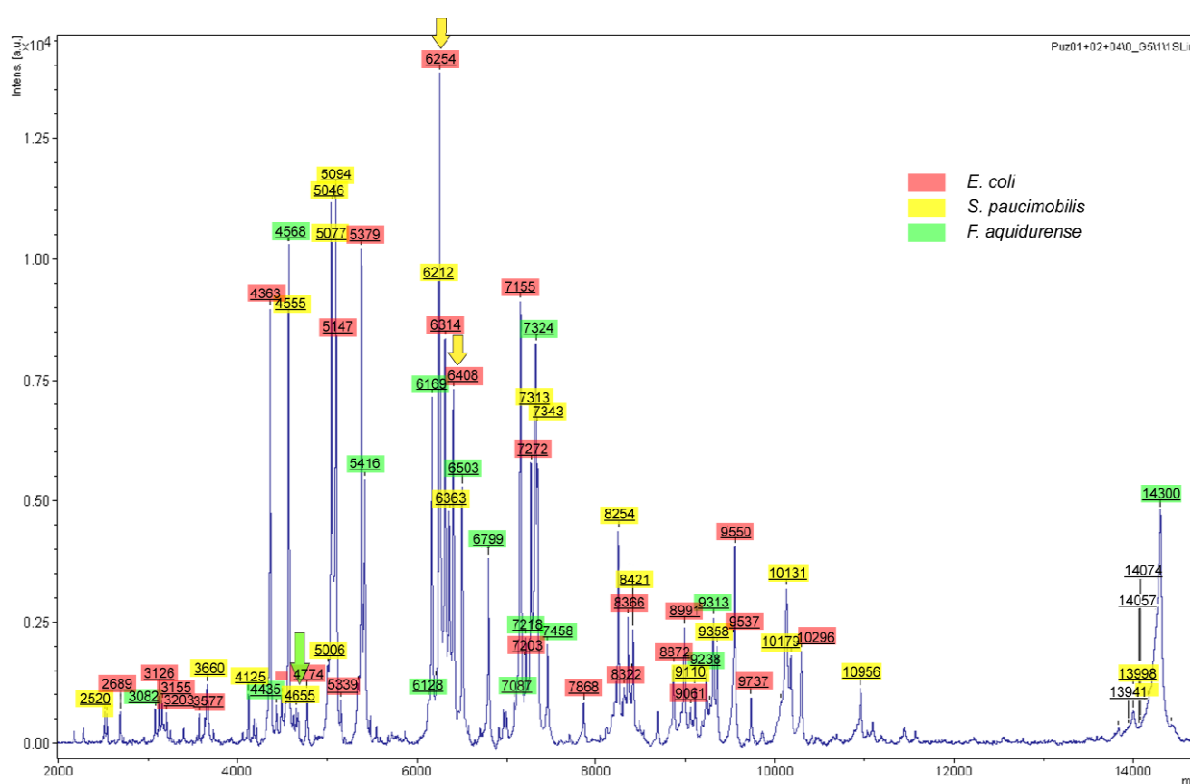


Abbildung 17: MS-Spektrum von Mischung der Ribosomen aus drei Mikroorganismen

Fingerprint-Spektrum von Mischungen der Ribosomen von *E. coli*, *S. paucimobilis* und *F. aquidurens*. Die Ribosomen wurden entsprechend der Proteinmengen gemischt. Die Peaks von *E. coli* sind rot markiert, die von *S. paucimobilis* gelb und die von *F. aquidurens* grün. Der Pfeil zeigt die überlagernden Peaks aus zwei Stämmen.

Mischung der Ribosomen aus vier Bakterien

Als weitere Stufe wurde *Arthrobacter citreus* DSM 20133^T zugegeben. *A. citreus* zählt zu Gram-positiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt. Die Isolierung der Ribosomen von diesem Bakterium war aufwendiger als bei der von Gram-negativen Bakterien. Erklärt werden konnte dies durch komplexe Zellwandstruktur von Gram-positive Bakterien. Bei einer Messung erhielt die Mischkultur nur 9 verfügbare Spektren.

Das MS-Spektrum der Ribosomen-Mischung aus *E. coli*, *S. paucimobilis*, *F. aquidurens* und *A. citreus* befindet sich in Abbildung 18. Dabei sind 40 Peaks zu sehen, deutlich weniger als die von den anderen zwei Mischungen. Der höchste Peak bei der Masse von 4363,37 Da hatte eine hohe Peaksintensität. Im Vergleich mit diesem Peak wurden viele kleine Peaks als Basislinie gekennzeichnet. Dieser Peak entspricht dem *E. coli* ribosomalen Protein L36 Peak (Masse 4364,11 Da) und dem von *A. citreus* bei der Masse von 4363,17 Da, beide besaßen auch in der Reinkultur eine hohe Peakintensität.

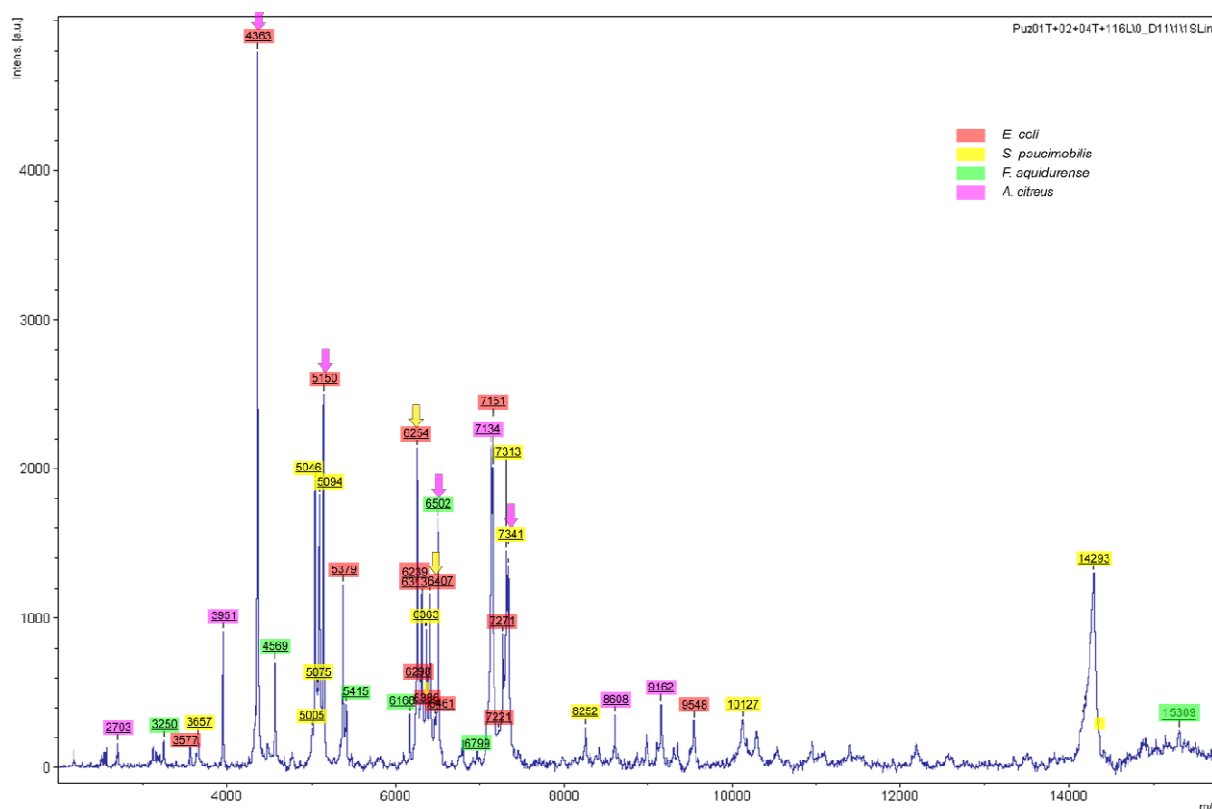


Abbildung 18: Das Spektrum von Mischung der Ribosomen aus vier Mikroorganismen

Fingerprint-Spektrum von Mischungen der Ribosomen von *E. coli*, *S. paucimobilis*, *F. aquidurens* und *A. citreus*. Rot markiert sind die Peaks von *E. coli*, die von *S. paucimobilis* gelb, von *F. aquidurens* grün und von *A. citreus* lila. Der Pfeil zeigt die überlagernden Peaks aus mehreren Stämmen.

Da *A. citreus* noch keine vollständigen Sequenzen besaß, wurden die Sequenzen von *A. aureescens* TC1 ausgewählt, dessen ribosomales Protein L36 ein Molekulargewicht von 4364,28 Da hat. Die beiden Protein-Sequenzen von L36 werden wie folgt gezeigt und die rot markierten Teile stellen den Unterschied zwischen den Sequenzen dar:

E. coli L36: MKV**R**ASVK**K**LCRN**C**KIV**K**R**D**GVIRVICS**A**EPKHKQRQG

A. aureescens L36: MKV**K**PSVK**Q**IC**D**K**C**KVIR**R**NGRVMVICEN**P**RHKQRQG

Dies sind zwei völlig unterschiedliche Proteine, obwohl ihre Molekulargewicht nur ein Differenz von 0,03 Da hat. Somit können sie in der MALDI-TOF MS nicht getrennt werden. Außerdem hatte *A. citreus* noch 3 überlagernde Peaks: bei 5149,54 Da mit *E. coli*, 6502,27 Da mit *F. aquidurens* und 7340,57 Da mit *S. paucimobilis*. *E. coli* und *S. paucimobilis* besaßen zwei überlappende Peaks. Weiterhin wurden 27,5% Peaks (11/40) zur *E. coli* eingeordnet, sowie 30% Peaks (12/40) von *S. paucimobilis*, 15% (6/40) von *F. aquidurens* und 12,5% (5/40) von *A. citreus* geliefert. Dadurch waren vier Bakterien in der Mischung nachweisbar.

Ribosomen-Mischung der fünf Mikroorganismen

Im weiteren Verlauf wurde *Pseudomonas putida* DSM 6125 bearbeitet. *P. putida* gehört zur Familie *Pseudomonadaceae*. Die Spezies ist ein Gram-negatives, sporenloses, gerades oder leicht gekrümmtes, polar begeißeltes Stäbchen. *P. putida* wurde total sequenziert und 31 Peaks in der Reinkultur von Ribosomen als ribosomalen Proteinen identifiziert.

In Abbildung 19 ist das Spektrum von der 5-Ribosomen-Mischung dargestellt. 60 Peaks beinhalteten 12 (20%) *E. coli* Peaks, 15 (25%) *S. paucimobilis* Peaks, 7 (12%) *F. aquidurens*, 6 (10%) *A. citreus*, 14 (23,33%) *P. putida* Peaks und 6 überlagernde Peaks. Anhand der Peakmassen wurden diese aufgetretenen *P. putida* Peaks ribosomalen Proteinen zugeordnet. Die 6 überlagernden Peaks waren identisch mit den im Spektrum der vier-Mischung. Die Differenzierung der 5 Bakterien resultiert aus den von jedem Stamm spezifischen Peaks.

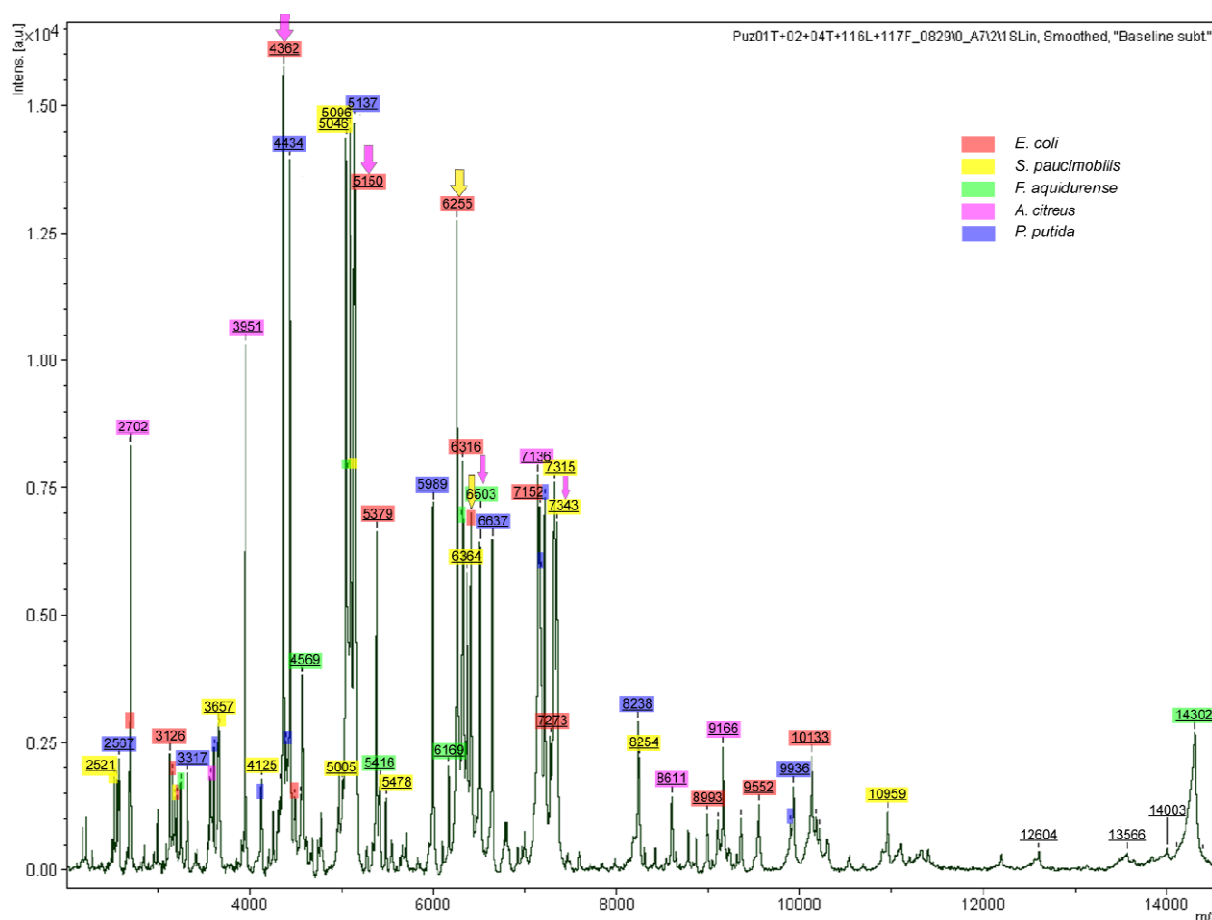


Abbildung 19: Das Spektrum von Mischung der Ribosomen aus fünf Bakterien

Fingerprint-Spektrum von Mischungen der Ribosomen von *E. coli*, *S. paucimobilis*, *F. aequidurens*, *A. citreus* und *P. putida*. Die Peaks von *E. coli* sind rot markiert, die von *S. paucimobilis* gelb, von *F. aequidurens* grün, von *A. citreus* lila und von *P. putida* blau. Der Pfeil zeigt die überlagernden Peaks aus mehreren Stämmen.

Mischung der Ribosomen aus sechs Bakterien

Das als letztes eingefügte Bakterium war *Sporosarcina macmurdoensis* DSM 15428^T. Es ist ein sporenbildender Gram-positiver Koccus mit niedrigem GC-Wert, welcher zur Familie *Bacillaceae* gehört. Bei der Isolierung der Ribosomen zeigte *S. macmurdoensis* die gleichen Probleme wie *A. citreus*.

Mit der MALDI-Analyse waren bei der Mischkultur von 6-Ribosomen nur 8 benutzbare Spektren zu gewinnen. Die Spektren waren komplexer als die von den anderen Mischungen. In Abbildung 20 wurde das Spektrum der 6-Ribosomen-Mischung illustriert, welche 57 Peaks besaß. Im Vergleich mit den Spektren des einzelnen Ribosomen wurden die Herkunft der Peaks ermittelt. Die Peakliste und Herkunft von Peaks wurden in Tabelle 11 aufgeführt.

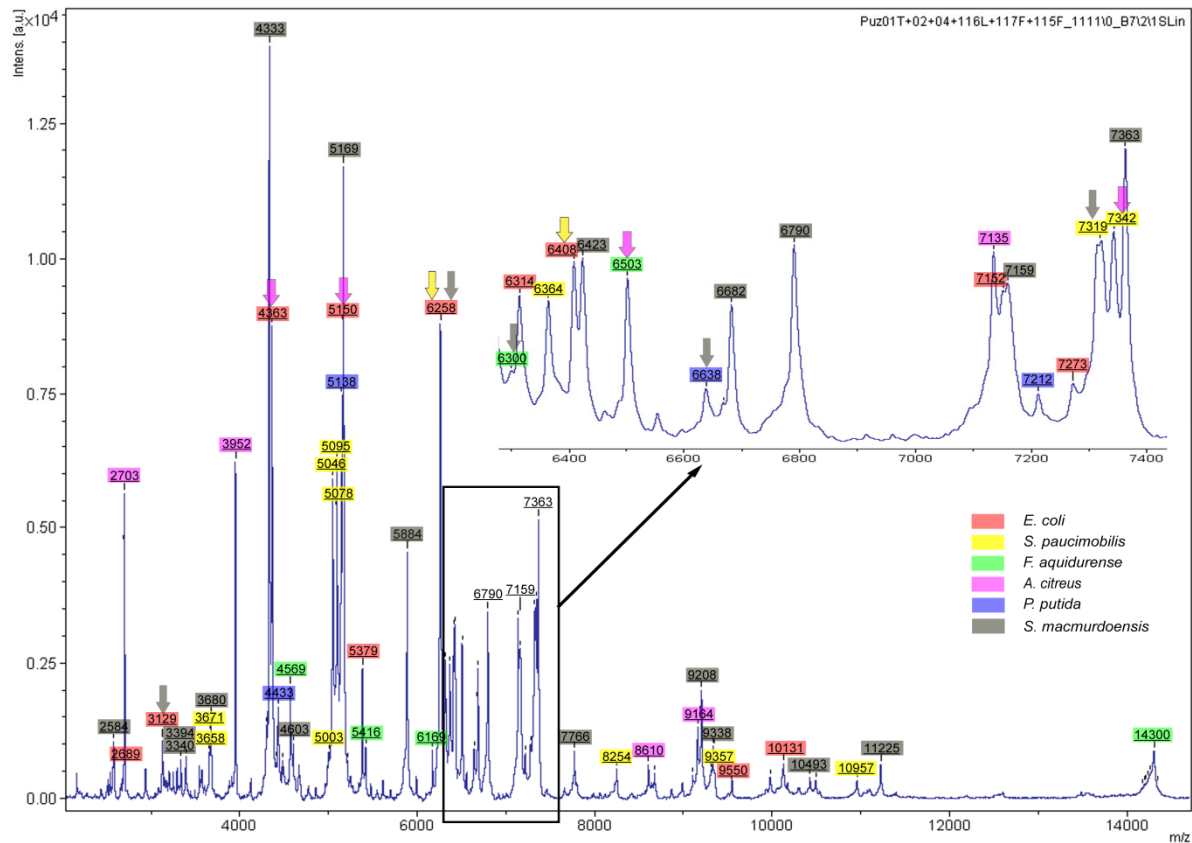


Abbildung 20: Das Spektrum von Mischung der Ribosomen aus sechs Bakterien

Fingerprint-Spektrum von Mischungen der Ribosomen von *E. coli*, *S. paucimobilis*, *F. auidurens*, *A. citreus*, *P. putida* und *S. macmurdoensis*. Die Peaks von *E. coli* sind rot markiert, die von *S. paucimobilis* gelb, von *F. aquidurens* grün, von *A. citreus* lila, von *P. putida* blau und von *S. macmurdoensis* schwarz. Der Pfeil zeigt die überlagernden Peaks aus mehreren Stämmen.

Tabelle 11: Peaklist der Ribosomen Mischung aus sechs Bakterien

Nr.	m/z	<i>E. coli</i>	<i>S. paucimobilis</i>	<i>F. aquidurens</i>	<i>A. citreus</i>	<i>P. putida</i>	<i>S. macmurdoensis</i>
1	2583,53						X
2	2688,64	L34 ²⁺					
3	2703,00				X		
4	3129,32	L33 ^{2+*}					X
5	3340,46						X
6	3394,35						X
7	3657,96		X				
8	3670,60		X				
9	3680,17						X
10	3951,65				X		
11	4332,76						X
12	4363,37	L36 ⁺			X		
13	4433,12					L36 ⁺	
14	4569,22			X			
15	4603,06						X
16	5003,33		X				
17	5046,33		X				
18	5078,38		X				

19	5094,54		x				
20	5137,63					L34 ⁺	
21	5150,39	S19 ^{2+*}			x		
22	5169,16						x
23	5379,41	L34 ⁺					
24	5416,19			x			
25	5884,00						x
26	6168,76			x			
27	6258,36	L33 ⁺ *m	x				x
28	6299,69			x			x
29	6313,71	L32 ⁺ *					
30	6363,86		x				
31	6408,38	L30 ⁺ *	x				
32	6423,14						x
33	6502,67			x	x		
34	6637,93					L20 ²⁺	x
35	6682,25						x
36	6790,36						x
37	7135,21				x		
38	7152,46	L35 ⁺ *					
39	7159,38						x
40	7212,25					L35 ⁺ *	
41	7272,76	L29 ⁺					
42	7318,61		x				x
43	7342,45		x		x		
44	7362,71						x
45	7765,63						x
46	8253,87		x				
47	8609,62				x		
48	9164,33				x		
49	9208,18						x
50	9337,63						x
51	9356,82		x				
52	9550,48	S20 ⁺ *, L26 ⁺ *					
53	10130,99	S15 ⁺ *					
54	10493,14						x
55	10956,94		x				
56	11224,78						x
57	14299,82			x			

Aus der Tabelle geht hervor, dass 17,5% der Peaks (10/57) überlagernde Peaks waren. Außer den sechs überlagernden Peaks aus der 5-Ribosomentyp-Mischung besaß *S. macmurdoensis* mit *E. coli* (3129,32 Da), *F. aquidurens* (6299,69 Da), *P. putida* (6637,92 Da) und *S. paucimobilis* (7318,61 Da) gemeinsame Peaks. Ebenfalls ein Peak von 6258,36 Da stammte aus drei Bakterien. Die Zusammensetzung der Peaks war: 12,28% (7/57) *E. coli*, 17,54% (10/57) *S. paucimobilis*, 7,02% (4/57) *F. aquidurens*, 8,77% (5/57) *A. citreus*, 5,26% (3/57) *P.*

putida und 31,58% (18/57) *S. macmurdoensis*.

Die Spektren zeigen dass bis zu 6 Bakterien in den Mischkulturen von Ribosomen mittels der MALDI-Methode differenziert werden konnten.

3.3.3.2 Die 6-Organismen-Mischkultur

Die in 3.3.3.1 verwendeten sechs Bakterien wurden auf dem Nährmedium R2A gezüchtet und nach dem OD-Wert gleichmäßig zusammengemischt. Davon wurde eine gesamte Ribosomenpräparation hergestellt (siehe 2.5.4).

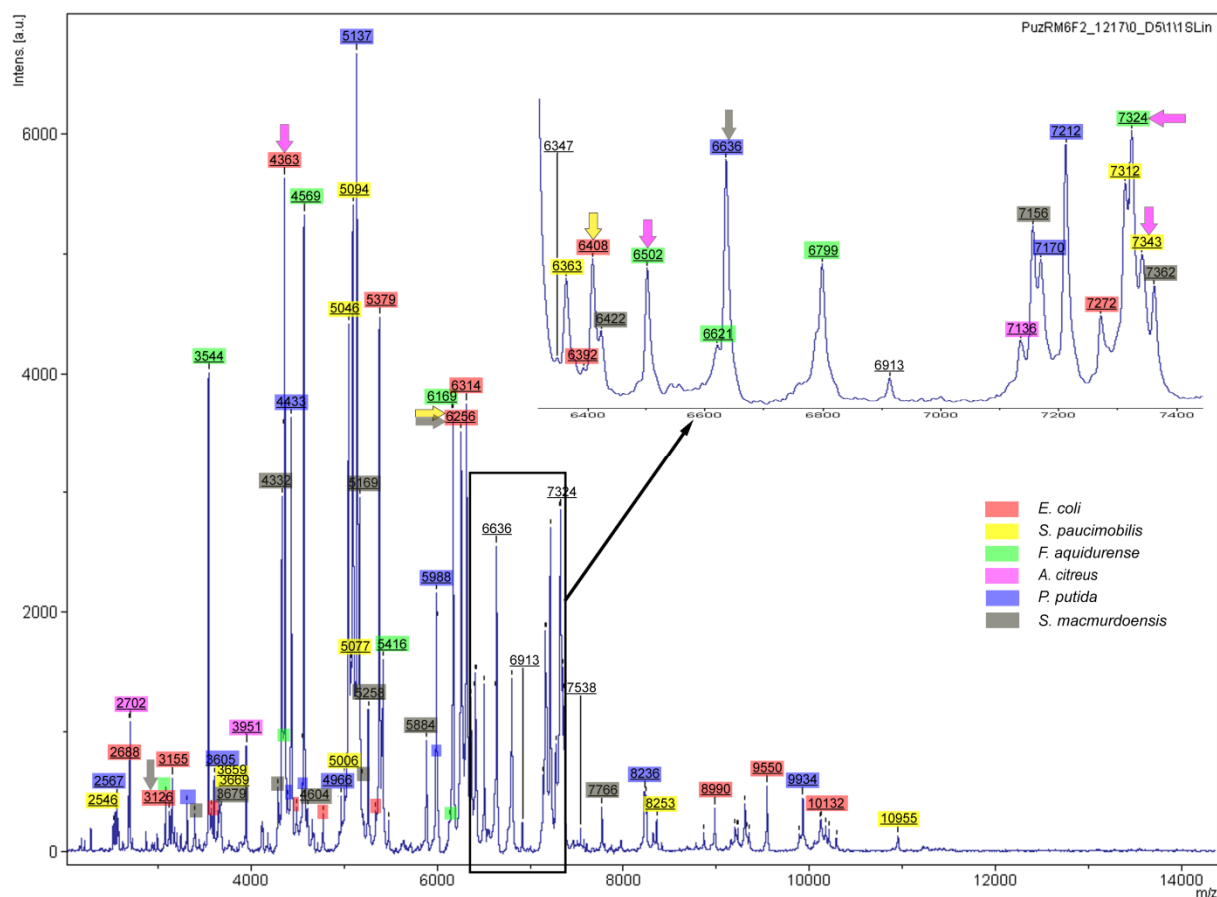


Abbildung 21: Das Spektrum der gesamten Ribosome aus sechs-Bakterien Mischung

Fingerprint-Spektrum der Ribosomen von Mischungen der *E. coli*, *S. paucimobilis*, *F. aquidurens*, *A. citreus*, *P. putida* und *S. macmurdoensis*. Die Peaks von *E. coli* sind rot markiert, die von *S. paucimobilis* gelb, von *F. aquidurens* grün, von *A. citreus* lila, von *P. putida* blau und von *S. macmurdoensis* schwarz. Der Pfeil zeigt die überlagernden Peaks aus mehreren Stämmen.

Die Messungen der Ribosomen waren generell schwierig, da nur 3 von 16 Spektren bei der einmaligen Messung eine gute Qualität hatten. Das resultierende Spektrum wurde in Abbildung 21 dargestellt. Dabei waren 71 Peaks aufgetreten, die aus 18,31% (13 Peaks) *E. coli*, 15,49% (11 Peaks) *S. paucimobilis*, 12,68% (9 Peaks) *F. aquidurens*, 4,23% (3 Peaks) *A. citreus*, 19,72% (14 Peaks) *P. putida* und 18,31% (13 Peaks) *S. macmurdoensis* stammten.

Noch weitere 8 Peaks waren die überlagernden Peaks, die in der Ribosomen-Mischung auch gefunden wurden, außer dem Peak von 7323,55 Da.

Nachdem die Mischungen von Ribosomen mittels MALDI-TOF MS charakterisiert wurden, sollte ein Überblick über die Analyse der Mischkulturen gewonnen werden. In Tabelle 12 wurde dargestellt, wie viele Peaks des einzelnen Stammes in verschiedenen Mischungen wiedergefunden wurden.

Tabelle 12: Überblick über die Anzahlen der Peaks in Mischkulturen

	1R	2R	3R	4R	5R	6R	RM6
<i>E. coli</i>	36R/43	21	25	11	12	7	13
<i>S. paucimobilis</i>	43	26	22	12	15	10	11
<i>F. aquidurens</i>	48	-	15	6	7	4	9
<i>A. citreus</i>	21	-	-	5	6	5	3
<i>P. putida</i>	31R/48	-	-	-	14	3	14
<i>S. macmurdoensis</i>	45	-	-	-	-	18	13
Überlagernden Peaks	-	2	3	6	6	10	8
Gesamtzahl	-	49	65	40	60	57	71

R: Ribosomen; 1R: Ribosomen von Reinkultur.; 2R-6R: Ribosomen Mischung.

RM6: Ribosomen der 6-Organismen Mischung.

Diese Tabelle zeigte, dass die spezifischen Peaks jedes einzelnen Stammes bei Mischungen der Ribosomen von zwei bis sechs verschiedenen Bakterien wieder erkannt und sogar einsortiert werden. Mittels solcher Peaks können verschiedene Bakterien in den Mischungen differenziert werden.

Des Weiteren wurde der Zellextrakt der 6-Bakterien-Mischung in MALDI-TOF MS gemessen (Abbildung 22). Die Spektren waren gut reproduzierbar. Im Vergleich mit der Ribosomen-Mischung wurden die Referenz-Massen von verschiedenen Stämmen außer 6 Peaks (3 Peaks von *S. macmurdoensis*, 2 Peaks von *S. paucimobilis* und ein *A. citreus*-Peak) in den vorhandenen 74 Peaks wieder erkannt, aber mit niedriger relativer Signalintensität. Ein Peak von 3821 Da hatte die höchste Peaksintensität, dieser war aber nicht in den Spektren der Ribosomen vorhanden. Dieser Peak wurde in 3.4 detailliert untersucht.

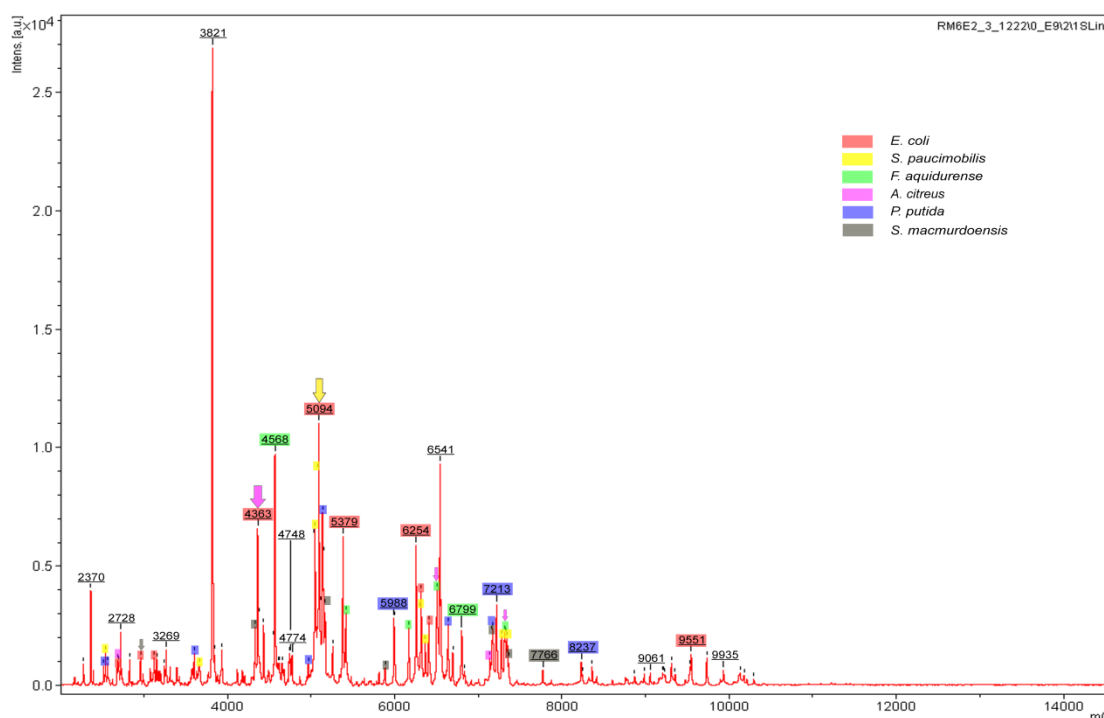


Abbildung 22: Das Spektrum der sechs-Bakterien Mischung

Fingerprint-Spektrum der Zellextrakt von Mischungen der 6 Bakterien. Die Peaks von *E. coli* sind rot markiert, die von *S. paucimobilis* gelb, von *F. aquidurens* grün, von *A. citreus* lila, von *P. putida* blau und von *S. macmurdoensis* schwarz. Der Pfeil zeigt die überlagernden Peaks aus mehreren Stämmen.

Mit Hilfe der durchgeführten Analysen konnte festgestellt werden, dass die mikrobiellen Mischkulturen aus bis zu 6 Stämmen mittels der MALDI-TOF Methode differenziert werden konnten.

3.4 Einfluss von Medien und Wachstumszeit

In diesem Teil wurde der dominante Peak mit 3821 Da im Spektrum von Extrakten der 6-Organismen Mischkultur (Abb. 22) analysiert.

Zuerst wurde ermittelt, ob die Peaks Kontaminanten waren. Dazu wurden die Nährmedien LB und R2A einzeln in MALDI-TOF MS gemessen, lieferten jedoch keine Spektren.

Dann wurde die Herkunft des Peaks bestimmt. Der Vergleich des Spektrums von Extrakten der 6-Organismen Mischkultur mit den Spektren von Reinkulturen zeigte, dass der Peak und noch ein Peak von 2369,91 Da aus *E. coli* in R2A-Medium gewachsenen Kultur stammten. Die zwei Peaks waren bei Analysen von anderen *E. coli* Kulturen, die in LB-Medium gezüchtet wurden, nicht nachweisbar. Eine weitere Untersuchung wurde mit dem in der Mischkultur verwendeten *E. coli* Stamm durchgeführt. Dafür wurde *E. coli* unter gleichen Bedingungen auf LB- und R2A-Agarplatten kultiviert, danach die geernteten Zellen

ausgetauscht und in einem anderen Medium weiter gezüchtet (siehe 2.6.1). Von allen Platten wurden Proben genommen und mittels der MALDI-Methode analysiert. Mit BioTyper Software wurden alle Proben als *E. coli* identifiziert. Die zwei Peaks traten nur in Spektren der auf R2A Agarplatten kultivierten *E. coli*-Zellen auf.

Weiterhin wurde das Wachstum von *E. coli* in Flüssigmedien LB und R2A genau beobachtet und die pH-Werte in beiden Kulturen bestimmt (siehe 2.6.1). In Abbildung 23 wurden die Wachstumskurven und die Veränderung der pH-Werte dargestellt. Nach vier Stunden erreichten die *E. coli*-Zellen in der LB Kultur schon eine optische Dichte (578 nm) von 1,05, während bei der R2A Kultur nach vier Stunden nur ein OD von 0,32 gemessen wurde, der 11 Stunden nach dem Impfen bis auf 0,82 gestiegen war. Daraus war zu ersehen, dass *E. coli* im LB-Medium schneller als im R2A-Medium wuchs.

Beim pH-Wert gingen die beiden Kulturen zuerst in den sauren Bereich. Ab 4 Stunden stieg der pH-Wert in der LB Kultur, aber der in der R2A sank weiter bis auf den tiefsten Wert von 5,3 (7 Stunden). Dies bestätigt sich auch bei einer Mehrfachanalyse.

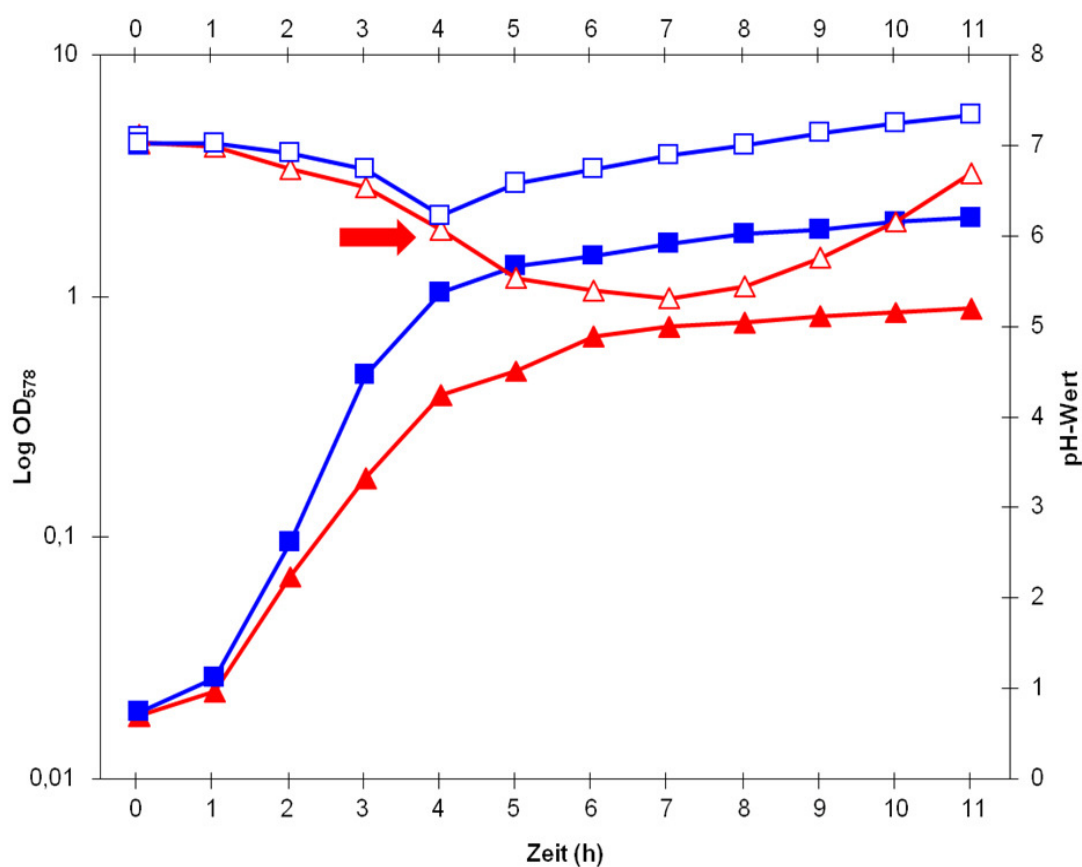


Abbildung 23: Wachstum des *E. coli* Stamms in LB- und R2A Flüssigmedien

Blaue Linie bezeichnet die *E. coli* im LB-Medium, rote Linie *E. coli* in der R2A Kultur. □ pH-Wert von *E. coli* im LB-Medium, △ pH-Wert von *E. coli* Kultur im R2A-Medium. ■ OD-Wert von der LB Kultur, ▲ OD-Wert von der R2A Kultur.

Um den Einfluss von verschiedenen Nährmedien auf die MALDI Spektren zu überprüfen, wurden die Zellen von beiden Kulturen stündlich abgenommen und im MALDI-TOF MS gemessen.

In den ersten 3 Stunden hatten die Spektren von beiden Kulturen große Ähnlichkeiten. Die Spektren der *E. coli*-Kultur, die im LB Medium angezogen wurde, zeigte während des Wachstums keine signifikanten Veränderungen. Die zwei untersuchten Peaks waren in solchen Spektren nicht vorhanden. Aber ab der vierten Stunde der Inkubationszeit traten in den *E. coli*-Spektren in der R2A Kultur zwei zusätzliche Peaks auf, die sogar dominant waren. Die Peaks erreichten nach 7 Stunden die höchsten Intensitäten. In Abbildung 24 wurden die Spektren von verschiedenen Zeiten (Ausgangspunkt und 7 Stunden) und Medien (LB und R2A) dargestellt. Es wurde vermutet, dass die beiden Peaks durch das besonders saure Milieu hervorgerufen wurden.

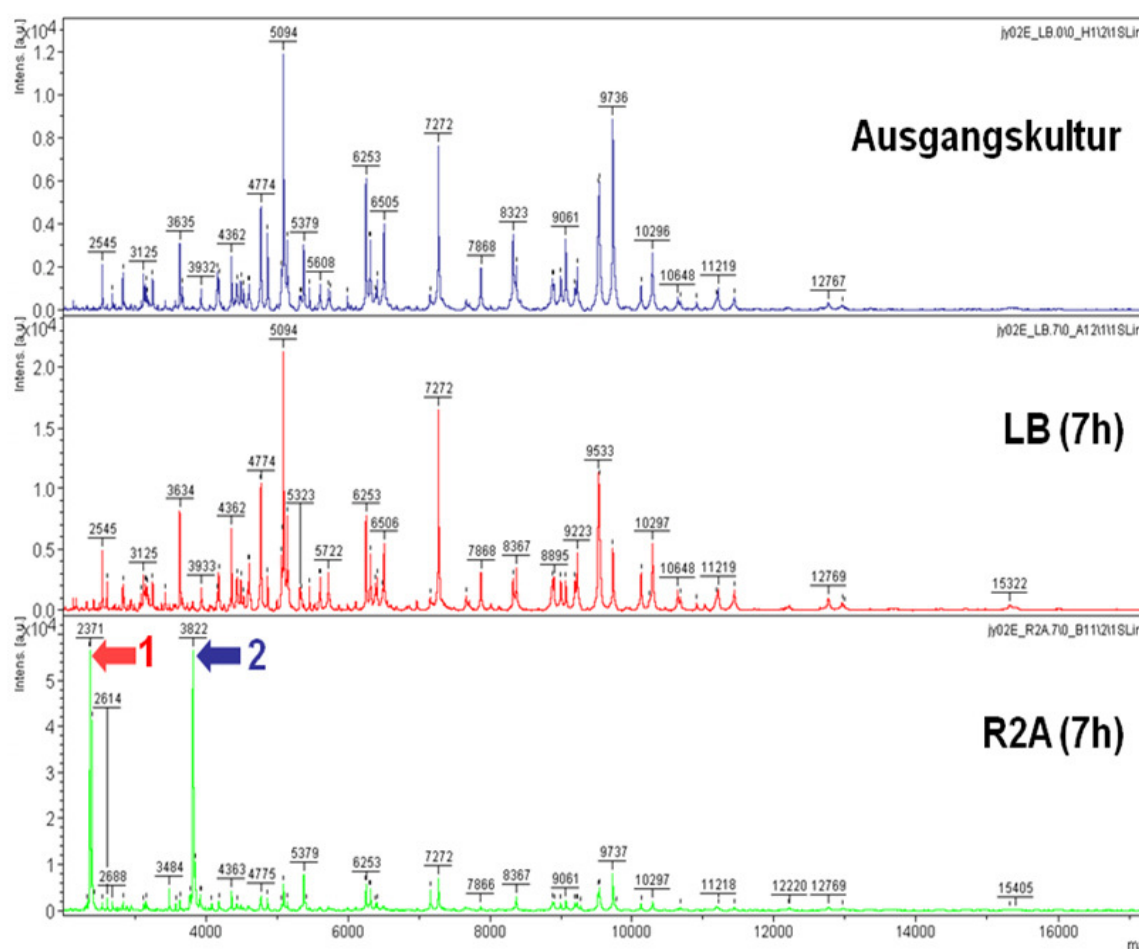


Abbildung 24: Einfluss von verschiedenen Zeiten und Nährmedien auf Zellextrakt

Oben ist das Spektrum von der Ausgangskultur im LB-Medium. Das mittlere Spektrum zeigt die im LB Medium inkubierten *E. coli* Zellen nach 7 Stunden). Das untere ist die *E. coli* Kultur, die im R2A Medium 7 Stunden gezüchtet wurde. Der Pfeil bezieht sich auf die zwei Peaks, die nur in der R2A Kultur gefunden wurden.

Diese Vermutung wurde unterstützt durch eine weitere Analyse, bei der die zwei Peaks mittels MALDI TOF/TOF MS im Reflektormodus sequenziert (siehe 2.6.2) wurden. Nach längerer Fragmentierung wurde ein Spektrum aufgenommen, bei dem die einzelnen Fragmentionen wie auch Immoniumionen gemessen werden konnten. Die MALDI TOF/TOF Spektren werden in Abbildung 25 gezeigt.

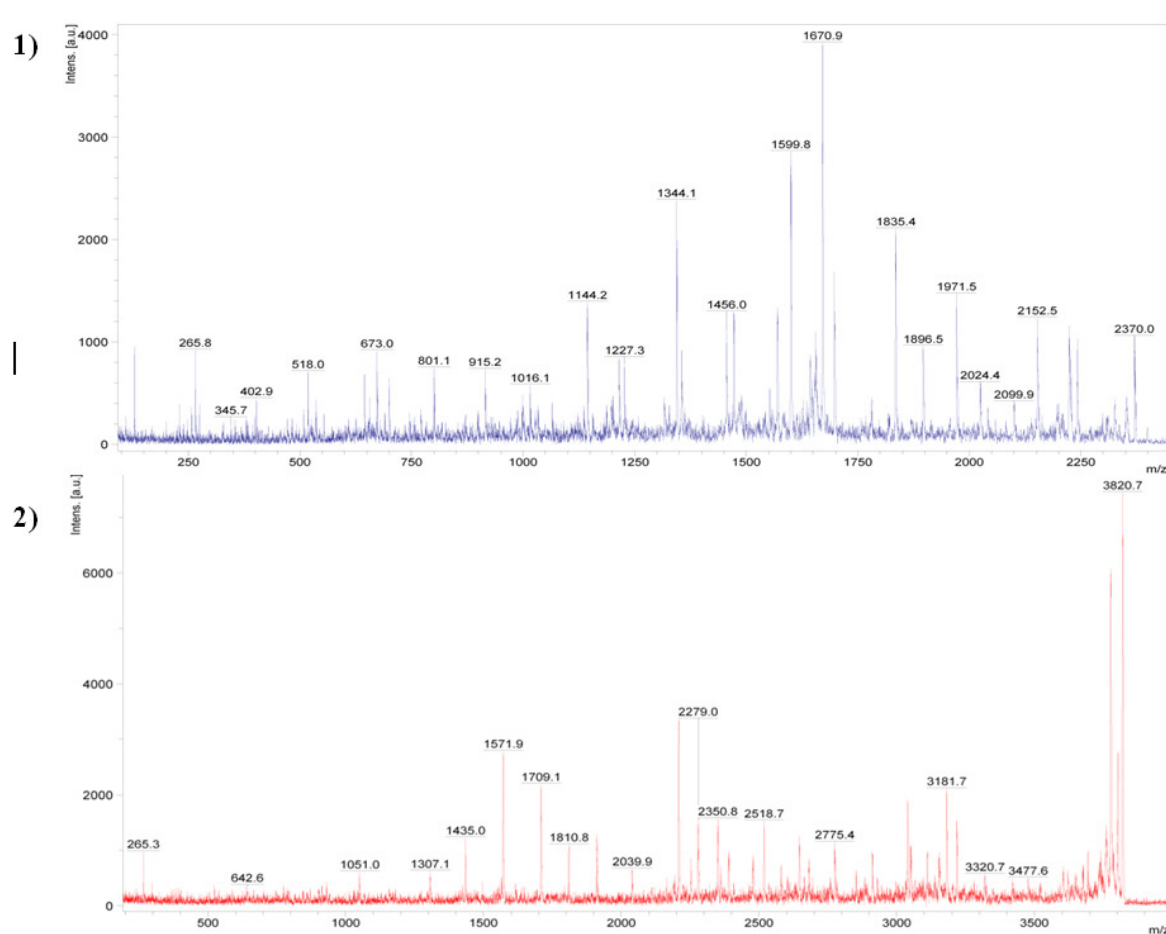


Abbildung 25: MALDI TOF/TOF Spektren von zwei untersuchten Peaks

1) MS/MS Spektrum (MALDI TOF/TOF) von Peak 2371 Da; 2) MS/MS Spektrum des Signals bei der Masse 3821 Da.

Die Auswertung erfolgte mittels Mascot-Datenbanksuche und die Ergebnisse sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13: Liste der MALDI TOF/TOF Daten

Nr.	Datenbank-nummer	Name	Ions score ^a	Grenzwert 1 ^b	Grenzwert 2 ^c	Gemessene Masse	Peptid-sequenz
1	gil89108438	acid shock-inducible periplasmic protein [Escherichia coli W3110]	107	48	54	2371,1	AAKKH HKNTK AEQKA PEQKA Q
2	gil89108438	acid shock-inducible periplasmic protein [Escherichia coli W3110]	118	36	57	3820,7	AAETT TTPAP TATTT KAAPA KTTHH KKQHK

a: Ions Score > Grenzwert 1 kennzeichnet die Peptididentifikationen mit signifikanter Homologie (*significant homology*); b: Ions Score > Grenzwert 2 kennzeichnet die Peptididentifikationen mit Identitätsgarantie (*identity or extensive homology*).

Aus diese Tabelle geht hervor, dass die zwei untersuchten Peaks zu einem Protein gehörten: dem säureschock-induzierbaren periplasmischen Protein. Dieses Ergebnis unterstützt die Ergebnisse der Untersuchung vom pH-Wert in der *E. coli*-R2A-Kultur.

3.5 Charakterisierung des Laborgemisches (Blindversuche)

Nachdem gezeigt wurde, dass mittels MALDI-TOF MS verschiedene Mischungen von Ribosomen differenziert werden konnten, sollten in diesem Teil Mischkulturen der verschiedenen Bakterienzellen charakterisiert werden.

Um einen möglichst guten Überblick über die Anwendungsgebiete zu erhalten, wurden vier Bereiche berücksichtigt. Von jedem Bereich wurden fünf gut identifizierte Spezies als Vertretung ausgewählt und eine künstliche Mischkultur hergestellt (siehe 2.7). Die erhaltenen Spektren wurden mit BioTyper 2.0 ausgewertet.

1) Klinische Proben

Für die Mischkultur der klinischen Proben wurden häufig in Krankenhäusern auftretende pathogene Keime gemischt. Dabei handelte es sich um *Acinetobacter haemolyticus* und *Pseudomonas aeruginosa*, die zur Ordnung *Pseudomonadales* im Klasse der *Gammaproteobacteria* gehören, außerdem *Klebsiella pneumoniae*, ein Vertreter aus der Ordnung *Enterobacteriales* sowie *Enterococcus faecium* und *Staphylococcus aureus* zwei Gram-positiven Kokken.

Die BioTyper Ergebnisse wurden in Tabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 14: BioTyper Ergebnisse von der Mischkultur der klinischen Proben

Eingegebene Stämme	Ergebnisse der Identifikation	Log Score
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 346	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 3463	1,706
<i>Enterococcus faecium</i> DSM 3146	<i>Enterococcus faecium</i> 20218_1 CHB	1,687
<i>Acinetobacter haemolyticus</i> DSM 6962	<i>Acinetobacter haemolyticus</i> DSM 6962_DSM	1,567
<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM 799	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> 9295_1 CHB	1,554
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 1128	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 8147_2_CHB	1,533

Auffallend waren die niedrigen Scoren: nur der Score für *S. aureus* war über 1,7, während die anderen niedrige Scoren zwischen 1,553 und 1,687 hatten. Dies war nicht überraschend, da die Software BioTyper 2.0 für Identifizierung der Reinkulturen entwickelt wurde. Durch die Untersuchung mit MALDI-TOF MS und die Auswertung mit BioTyper konnten die fünf Bakterien detektiert und differenziert werden.

Die MS-Spektren für die Mischkultur und die jeweiligen Reinkulturen sind in Abbildung 26 dargestellt.

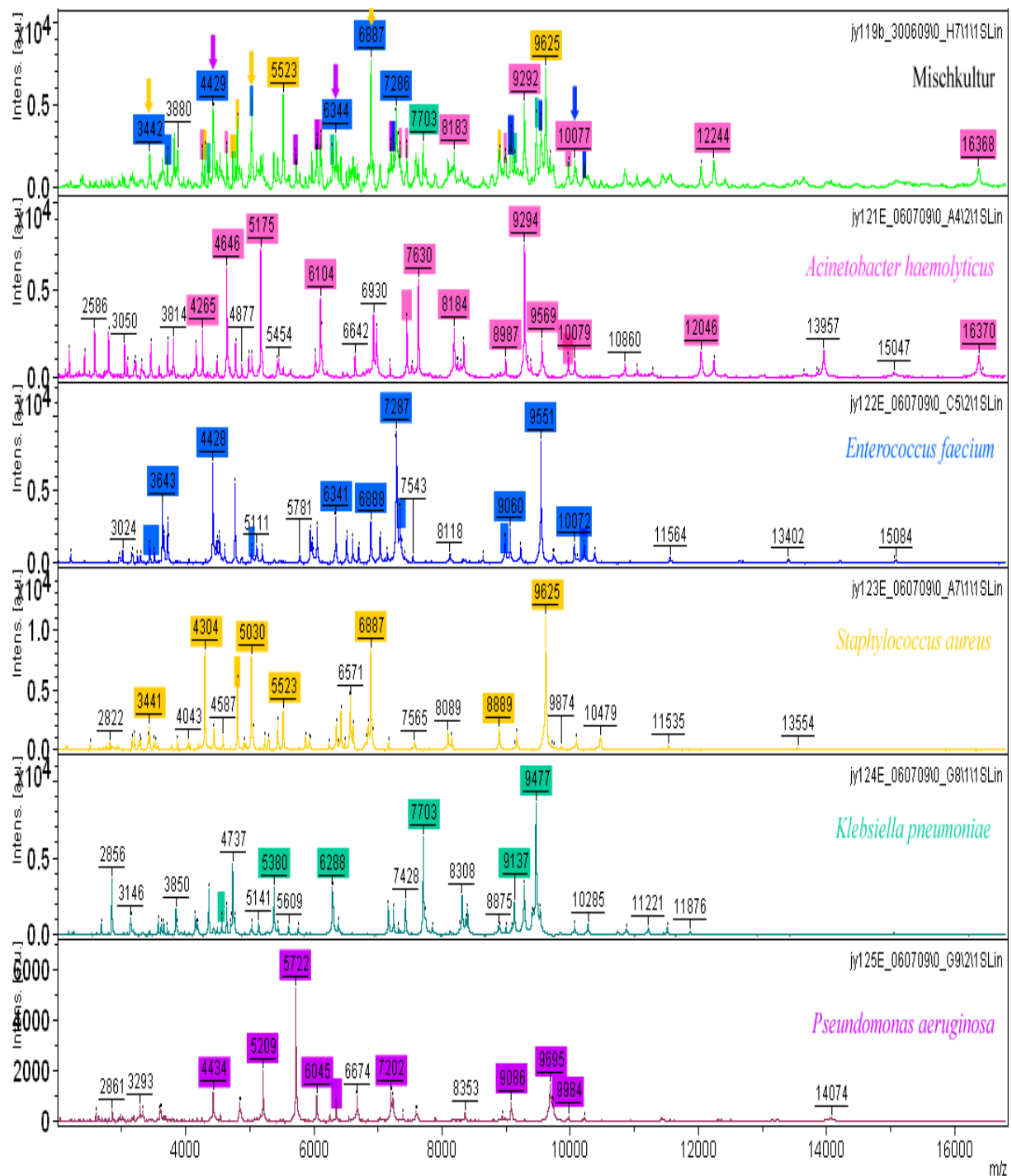


Abbildung 26: Identifizierung verschiedener Bakterien in einer Mischung der klinischen Proben

Von oben bis unten sind MALDI-TOF-MS-Spektren von der Mischung und jeder der fünf Bakterienspezies gezeigt: *A. haemolyticus* DSM 6962, *E. faecium* DSM 3146, *S. aureus* DSM 346, *K. pneumoniae* DSM 799 und *P. aeruginosa* DSM 1128. Spezies-spezifische Peaks wurden in Spektren mit verschiedenen Farben angegeben.

2) Milchprodukte

Alle in dieser Mischkultur beteiligten Bakterien sind Gram-positiv. *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus reuteri* und *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* sind nahe verwandt und gehören zur Ordnung der Milchsäurebakterien (*Lactobacillales*). Die *Lactobacillus*-Stämme

sind sporenlose, fakultativ anaerobe Stäbchen und kommen in der Magen- und Darm-Mikroflora von Menschen und Tieren vor. *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* ist ein fakultativ anaerobes, sporenloses und unbewegliches Bakterium, das sehr weit verbreitet ist. *Bifidobacterium longum* und *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* zählen zur Klasse *Actinobacteria* (hoher GC-Gehalt). *Bifidobacterium longum* ist ein anaerobes, verzweigtes Stäbchen und wird im Darm von Säuglingen gefunden. *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* ist ein unbewegliches, sporenloses, anaerobes oder aerotolerantes, mesophiles, gespaltenes oder verzweigtes Stäbchen.

In der Tabelle 15 wurden die Ergebnisse von der Mischkultur der Milchprodukte dargestellt.

Tabelle 15: BioTyper Ergebnisse von der Mischkultur der Milchprodukte

Eingegebene Stämme	Ergebnisse der Identifikation	Log Score
<i>Lactobacillus gasseri</i> DSM 20243 ^T	<i>Lactobacillus gasseri</i> DSM 20243 ^T	1,857
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17509	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 20015_DSM	1,697
<i>Bifidobacterium longum</i> DSM 20088	<i>Bifidobacterium longum</i> DSM 20088_DSM	1,521
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> DSM 20346 ^T	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> DSM 20346 ^T	1,368
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> DSM 4902	-	-

L. gasseri und *L. reuteri* wurden mit hohen Scores detektiert. *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* hatte einen Score von 1,368. *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* wurde gar nicht von BioTyper identifiziert. Um den Grund herauszufinden, wurde das Spektrum der Mischkultur mit einzelnen Reinkulturen verglichen (Abb. 27).

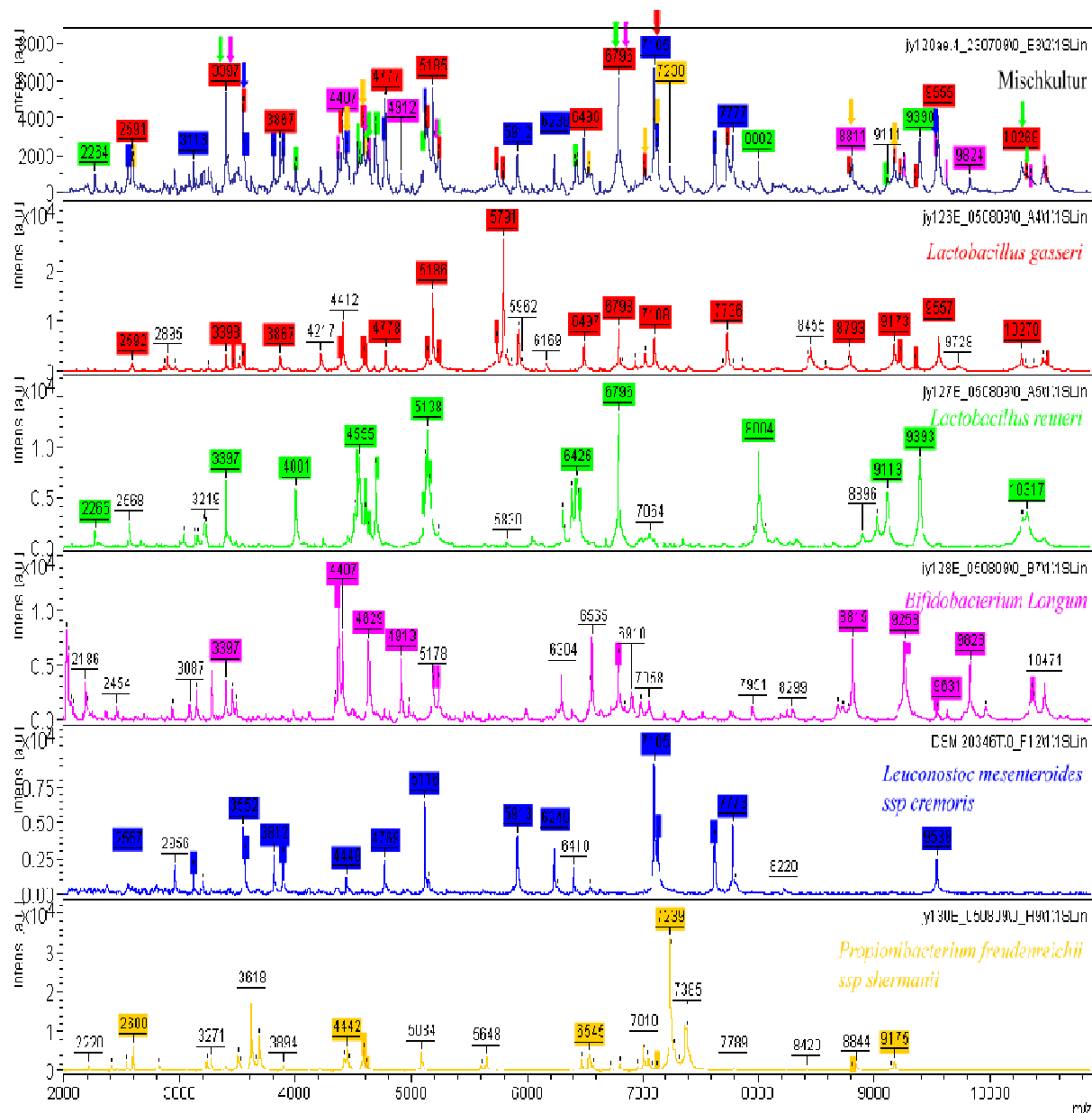


Abbildung 27: Identifizierung verschiedener Bakterien in einer Mischung der Milchprodukte

Von oben bis unten sind MALDI-TOF-MS-Spektren von Mischung und jeder der fünf Bakterienspezies: *L. gasseri* DSM 20243T, *L. reuteri* DSM 17509, *B. Longum* DSM 20088, *L. mesenteroides* ssp. *cremoris* DSM 20346T und *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* DSM 4902. In Spektren mit verschiedenen Farben markierten Peaks sind speziesspezifische Peaks.

Im Spektrum der Mischkultur gab es 67 Peaks, davon wurden 17 von zwei oder drei Bakterienstämmen geliefert. Für *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* wurden 10 Peaks im Misch-Spektrum gefunden, aber 7 waren überlagernde Peaks. Nur drei Peaks bei 2598,53 Da, 6539,78 Da und 7238,15 Da mit niedrigen Intensitäten waren für diesen Stamm spezifisch. Für die Auswertung mit BioTyper 2.0 waren diese Signale zu gering zur Identifizierung des Stamms in der Mischkultur.

3) Fleischverderbenden Organismen

Salmonella enterica ssp. *enterica* ist eine Subspezies von *S. enterica* und zählt zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Es handelt sich um Gram-negative, aerobe, begeißelte Stäbchen. *Listeria monocytogenens* und *Brochothrix thermosphacta* gehören zu Gruppe *Listeriaceae*. *L. monocytogenens* ist ein Gram-positives, nicht sporenbildendes, fakultativ-anaerobes Stäbchen, das aufgrund einer peritrichen Begeißelung beweglich ist. Es ist in Menschen, Tieren, Pflanzen, Boden, Gewässern und anderen Lebensräumen nachweisbar. *Brochothrix thermosphacta* besitzt während des Wachstums verschiedene morphologische Stadien wie coccobacillus und kurze Stäbchen in Ketten. *Kurthia gibsonii* gehört zur Gruppe der *Bacillales* und ist ein sporenloses, nicht pigmentiertes, aerobes Gram-positives Stäbchen, das bei ca. 42 °C wächst. *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni* ist ein Gram-negatives, mikroaerophiles und polar begeißeltes spiralförmiges Bakterium, welches bei Menschen vor allem Durchfallerkrankungen auslösen kann.

Tabelle 16: BioTyper Ergebnisse von der Mischkultur der fleischverderbenden Organismen

Eingegebene Stämme	Ergebnisse der Identifikation	Log Score
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> DSM 4224	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> DSM 4224	1,769
<i>Kurthia gibsonii</i> DSM 20636	<i>Kurthia gibsonii</i> DSM 20636	1,53
<i>Brochothrix thermosphacta</i> DSM 20171 ^T	<i>Brochothrix thermosphacta</i> DSM 20171 ^T	1,492
<i>Campylobacter jejuni</i> ssp. <i>jejuni</i> DSM 4688 ^T	<i>Campylobacter jejuni</i> ssp. <i>jejuni</i> DSM 4688 ^T	1,457
<i>Listeria monocytogenens</i> DSM 20600	<i>Listeria monocytogenens</i> DSM 20600	1,44

S. enterica ssp. *enterica* hatte den besten Identifizierungsscore von 1,769. Im Vergleich dazu besaß *L. monocytogenens* den niedrigsten Score von 1,44. Bei der Auswertung wurde die Datenbank modifiziert: von den ganzen *Salmonella* Spezies wurde nur ein Stamm ausgewählt.

4) Bierverderbenden Organismen

Enterobacter cloacae ist ein Gram-negatives, fakultativ-anaerobes peritriches begeißeltes Stäbchen, das zur Familie *Enterobacteriaceae* gehört. *Pectinatus cerevisiiphilus* und *Megasphaera cerevisiae* zählen zu Klasse *Negativicutes* in Phylum *Firmicutes*. *Alicyclobacillus acidocaldarius* ssp. *acidocaldarius* ist ein strikt aerober, acidophiler, thermophiler, Gram-positiver Bodenorganismus. *Pediococcus damnosus* gehört zur Gruppe der *Lactobacillales*.

Tabelle 17: BioTyper Ergebnisse von der Mischkultur der bierverderbenden Organismen

Eingegebene Stämme	Ergebnisse der Identifikation	Log Score
<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i> DSM 20466	<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i> DSM 20466	2,322
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> ssp. <i>acidocaldarius</i> DSM 446 ^T	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> ssp. <i>acidocaldarius</i> DSM 446 ^T	1,628
<i>Megasphaera cerevisiae</i> DSM 20462 ^T	<i>Megasphaera cerevisiae</i> DSM 20462 ^T	1,6
<i>Enterobacter cloacae</i> DSM 30054	<i>Enterobacter cloacae</i> DSM 30054	1,533
<i>Pediococcus damnosus</i>	-	-
-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,202

P. damnosus wurde nicht detektiert und *K. pneumoniae* war falsch identifiziert. Da für diese Bereiche nicht genug Referenzdaten in der Bruker Datenbank zu Verfügung standen.

Zusammengefasst konnten mindestens vier Bakterien in den im Labor hergestellten bakteriellen Gemeinschaften mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie detektiert werden.

3.6 Analyse von Bakterien in Baumaterialien mit Feuchteschäden

In diesem Abschnitt wurden drei Baumaterialien mit Feuchteschäden untersucht. Nach der Vorbereitung mittels Stomacher (siehe 2.8.2) wurden die Proben direkt mit der MALDI-Methode charakterisiert. Um die Einsetzbarkeit dieser Methode auf Umweltproben zu bestimmen, wurden die vorbereiteten Proben gleichzeitig mit einer kultivierungsabhängigen Methode und DGGE untersucht. Nach der Kultivierung wurden 44 erhaltene Isolate mit morphologischen, chemotaxonomischen, molekularbiologischen und MALDI-Methoden identifiziert.

3.6.1 Erstellung der MALDI-Datenbank für *Aktinomyceten*

Da die *Aktinomyceten*-Referenzstämme in der Bruker Datenbank nicht für die Analysen von Bakterien in Baumaterialien geeignet waren, wurde eine Datenbank von MS-Spektren für die *Aktinomyceten* erstellt.

Basierend auf der Studie von Kämpfer *et al.* (2009) wurden 142 *Actinomyceten*-Stämme aus den folgenden 11 Gattungen ausgewählt: *Amycolatopsis* (22 Typstämme), *Citricoccus* (2 Typstämme), *Isophtericola* (3 Typstämme), *Jiangella* (4 Typstämme), *Kribbella* (15 Typstämme), *Nocardia* (2 Stämme), *Nocardioopsis* (34 Typstämme + 3 Stämme), *Ornithinibacillus* (1 Typstämme + 1 Stamm), *Promicromonospora* (6 Typstämme + 7 Stämme), *Pseudonocardia* (25 Typstämme) und *Saccharopolyspora* (17 Typstämme). Die Liste, in der

die ausgewählten Spezies aufgeführt sind, befindet sich im Anhang. Die Stämme wurden kultiviert (siehe 2.3.2), extrahiert (siehe 2.10.2) und im MALDI-TOF MS gemessen (siehe 2.10.4).

Aus diesen Stämmen und den *Aktinomyceten*-Spezies in der Bruker Datenbank wurde die eigene Aktinomyceten-Datenbank Bruker_Action_291010 gebildet.

3.6.2 Direkte MALDI Analyse für Materialproben

Drei mit Stomacher vorbereiteten Umweltproben wurden wie in 2.9.1 erläutert präpariert und mittels MALDI-TOF MS direkt analysiert. Danach wurden die Spektren in BioTyper 2.0 gegen Datenbank bis zu Gattungsebenen identifiziert.

Für Probe jy311 wurde nur die Aktinomyceten-Datenbank verwendet und damit 5 Gattungen detektiert: *Actinomadura*, *Streptomyces*, *Brachybacterium*, *Microbacterium* und *Arthrobacter*. Die anderen zwei Proben wurden gegen die Bruker Datenbank ausgewertet. Bei jy312 wurden 5 Gattungen gefunden und bei jy313 nur drei Gattungen. Die Gattungen außer *Amycolatopsis* in Probe jy313 wurden mit niedrigem Score identifiziert. Die Zusammensetzung von Bakterien variierte erheblich in den verschiedenen Proben. In Tabelle 18 wurden die MALDI-BioTyper Ergebnisse aufgelistet.

Tabelle 18: MALDI-BioTyper Ergebnisse für Materialproben

Materialienprobe	Resultat des Vergleichs	Log Score
jy 311	<i>Actinomadura</i> *	1,207
	<i>Streptomyces</i> *	1,154
	<i>Brachybacterium</i> *	1,154
	<i>Microbacterium</i> *	1,132
	<i>Arthrobacter</i> *	1,076
jy 312	<i>Amycolatopsis</i>	1,579
	<i>Lactobacillus</i>	1,547
	<i>Pseudomonas</i>	1,28
	<i>Neisseria</i>	1,227
	<i>Nocardiopsis</i>	1,222
jy 313	<i>Amycolatopsis</i>	1,97
	<i>Brevibacterium</i>	1,232
	<i>Corynebacterium</i>	1,223

*: Für die Identifizierung der jy311 wurde die Aktinomyceten-Datenbank Bruker_Action_291010 verwendet.

3.6.3 Kultivierungsabhängige Untersuchungen

Die Kultivierung und Isolierung wurden wie in 2.9.2.1 und 2.9.2.2 erläutert durchgeführt. Aus

drei vorbereiteten Materialproben wurden 44 Isolate gewonnen.

Die gewonnenen Isolate wurden mit MALDI-TOF MS analysiert (siehe 2.9.2.3.4) und mit der BioTyper 2.0 Software gegen die Bruker und die Aktinomycceten-Datenbanken zur Spezies-Ebenen identifiziert. Zusätzlich wurden die morphologische Charakterisierung, Fettsäureanalyse und DAP-Bestimmung für die Isolate durchgeführt (siehe 2.9.2.3). Weiterhin wurden 20 Isolate für 16S rRNA Gensequenzierung ausgewählt. Die Aufbereitung (DNA-Extraktion, PCR, Sequenzierung) wurde in 2.9.3 beschrieben. Die Einordnung der 16S rRNA-Gensequenzen erfolgte mit der BLAST-Suche, mit der die Zugehörigkeit der Isolate zu Phyla/Klassen und Gattungen durchgeführt wurde.

Die Anzahl der Isolate variiert in verschiedenen Proben. 21 Isolate wurden aus Probe jy311 isoliert, während nur 7 Isolate aus jy313 gewonnen wurden. Die detektierten Gattungen waren in den einzelnen Proben unterschiedlich. Nur Stämme der Gattung *Bacillus* wurden in allen Proben gefunden, die anderen Gattungen traten jeweils nur in einer Probe auf.

Von den 44 Isolaten konnten 25 der Klasse der *Actinobacteria* zugeordnet werden, wobei Vertreter von Gattungen *Dietzia*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Nesterenkonia*, *Promicromonospora* und *Streptomyces* detektiert werden konnten. Weitere 17 Isolate gehörten zu *Firmicutes* und 2 zur Bakterienklasse *Gammaproteobacteria*. Darin wurden die Spezies der Gattung *Bacillus* am häufigsten gefunden. Ein Überblick über die Isolate wurde in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Zugehörigkeit der gewonnenen Isolate zur Phyla/Klasse und Gattungen

Phyla/Klasse	Gattungen	Materialienproben			Gesamt
		jy311	jy312	jy313	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Dietzia</i>	3			3
	<i>Microbacterium</i>	2			2
	<i>Micrococcus</i>		2		2
	<i>Micromonospora</i>		1		1
	<i>Nesterenkonia</i>			6	6
	<i>Promicromonospora</i>	2			2
	<i>Streptomyces</i>	9			9
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i>	5	7	1	13
	<i>Paenibacillus</i>		4		4
<i>Gamma-proteobacteria</i>	<i>Moraxella</i>		1		1
	<i>Pseudomonas</i>		1		1
Insgesamt 11 Gattungen		21	16	7	44

Die Identifizierung der Isolate basiert auf der morphologischen Differenzierung, MALDI-Spektren und den Vollsequenzen des 16S rRNA-Gens. Wesentliche Taxa (> 20% der Gesamtzahl) sind fett gedruckt.

3.6.3.1 Morphologische Charakterisierung

Zuerst wurde die morphologische Charakterisierung für die Isolate durchgeführt. Mit der morphologischen Charakterisierung sollte eine grobe Zuordnung der Isolate erhalten werden. Das Erscheinungsbild der Isolate war vielfältig. Die Farben der Kolonien reichten von weiß über gelb bis hin zu rot. Die Isolate der Gattung *Dietzia* bildeten die Kolonie, die eine glatte Oberfläche und orangene Farbe aufwies. Aus der Gattung *Micromonospora* wurde nur ein Isolat aus allen Proben erhalten, das durch sein orangefarbenes Substratmyzel erkennbar war. Die Kolonien von *Bacillus* waren rund, weich oder schleimig mit gelapptem Rand. Unter dem Mikroskop wurden die Endosporen der *Bacillus* beobachtet (Abb. 28).

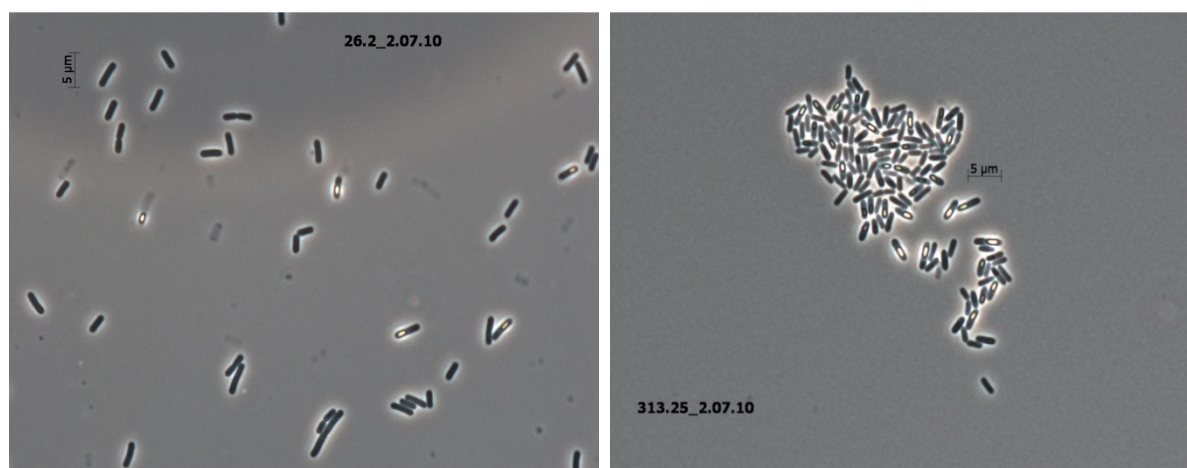


Abbildung 28: Zellen der *Bacillus*-Isolate mit Endosporen

Bacillus subtilis ssp. *subtilis* wurden von zwei Proben isoliert. Links ist das Isolat der *Bacillus* ssp. aus Probe jy311 und rechts aus Probe jy313.

Die meisten Kolonien waren rund, konvex, und hatten einen glatten Rand. Einige Isolate wurden unter dem Elektronenmikroskop klassifiziert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von drei Isolaten sind in Abbildung 29 dargestellt. Bei diesen Stämmen handelt es sich um *Dietzia natronolimnaea*, *Streptomyces tubercidicus* und *Micromonospora aurantiaca*.

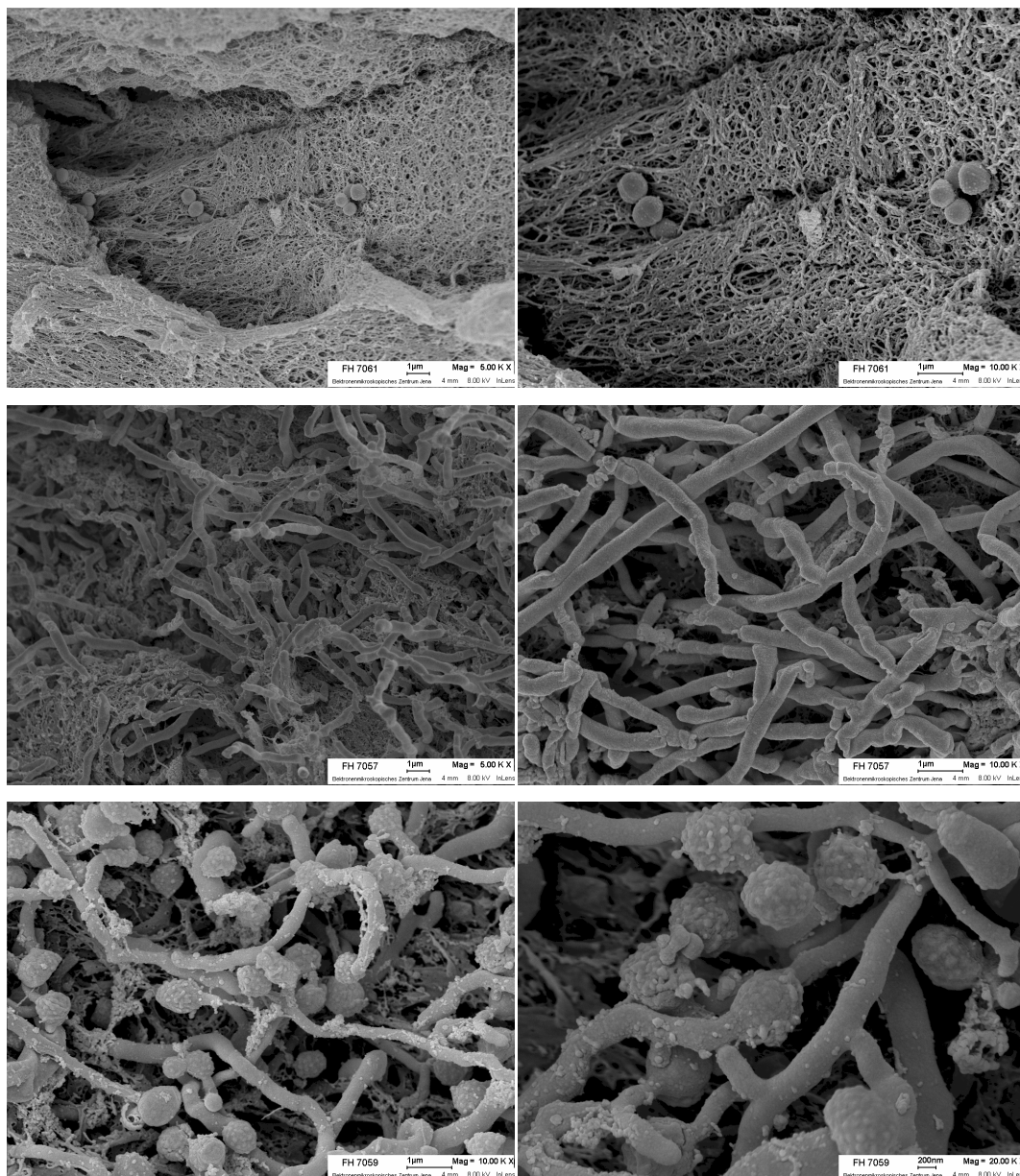


Abbildung 29: Elektronenmikroskopische Aufnahme von drei Isolaten

Von oben bis unten sind *Dietzia natronolimnaea* (FH 7061), *Streptomyces tubercidicus* (FH 7057) und *Micromonospora aurantiaca* (FH 7059).

Die Ergebnistabelle, in der die morphologischen Merkmale zu den Isolaten zusammengefasst sind, befindet sich im Anhang.

3.6.3.2 Chemotaxnomische Identifizierung

Fettsäureanalyse

Eine wichtige Methode in der chemotaxnomischen Klassifizierung ist die Fettsäureanalyse. In dieser Arbeit wurde die Zusammensetzung der Fettsäuren von Isolaten durch Gaschromatographie charakterisiert. Mit dem Midi-System wurden alle Isolate automatisch analysiert und ausgewertet. Die Isolate wurden wie in der Methode 2.9.2.3.2 beschrieben

gezüchtet und aufgearbeitet. Die Fettsäuremethylester wurden in der Gaschromatographie getrennt und die Signale entsprechen jeweils den einzelnen Fettsäuren.

Das Chromatogramm der Fettsäuren von Isolat jy312-9 wurde als Beispiel in Abbildung 30 dargestellt.

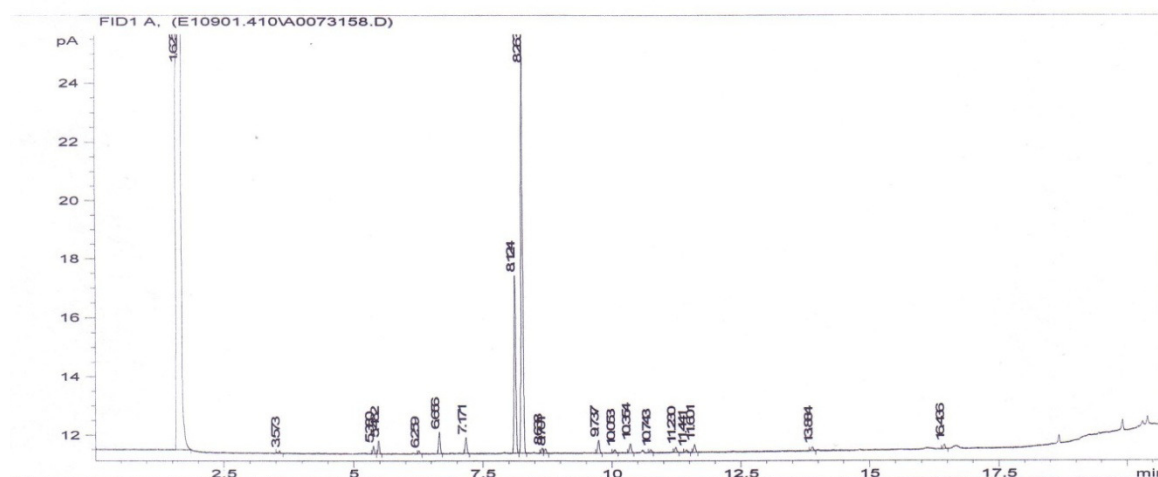


Abbildung 30: Chromatogramm der Fettsäurezusammensetzung von Isolat jy312-9 durch Gaschromatographie.

Die Methylester der Fettsäuren werden getrennt und die Signale entsprechen den einzelnen Fettsäuren mit ihrer spezifischen Retentionszeit.

Die Signale wurden vom MIDI-System automatisch erkannt und durch die Retentionszeiten in die passenden ECL-Werte umgewandelt. Durch den Vergleich der ECL-Werte mit der Referenzfettsäure in der Datenbank wurden die Signale mit den entsprechenden Fettsäuren benannt. Die gefundenen Fettsäuren wurden mit dem Chromatogramm aufgelistet (Abb. 31).

E109014.10A [23158] UN-JUN-JY312-9.4(2d,28C)

Page 1

Volume: DATA File: E109014.10A Samp Ctr: 7 ID Number: 23158
 Type: Samp Bottle: 14 Method: TSBA40
 Created: 9/1/2010 12:22:52 PM
 Sample ID: UN-JUN-JY312-9.4(2d,28C)

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.625	4.571E+8	0.025	----	7.014	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
3.573	373	0.033	1.032	10.695	11:0 ANTEISO	0.36	ECL deviates 0.000	Reference -0.005
5.380	983	0.030	0.990	12.614	13:0 ISO	0.91	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
5.482	1756	0.031	0.989	12.703	13:0 ANTEISO	1.63	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
6.259	382	0.031	----	13.325		----		
6.656	3094	0.032	0.982	13.618	14:0 ISO	2.85	ECL deviates -0.001	Reference -0.002
7.171	2429	0.035	0.981	13.999	14:0	2.23	ECL deviates -0.001	Reference -0.002
8.124	28005	0.035	0.981	14.623	15:0 ISO	25.73	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
8.263	63091	0.036	0.981	14.714	15:0 ANTEISO	57.98	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
8.638	765	0.034	0.981	14.960	unknown 14.959	0.70	ECL deviates 0.001	
8.701	742	0.039	0.981	15.001	15:0	0.68	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
9.737	2165	0.039	0.983	15.627	16:0 ISO	1.99	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
10.053	541	0.039	0.984	15.818	Sum In Feature 3	0.50	ECL deviates -0.004	16:1 w7c/15 iso 2OH
10.354	1552	0.037	0.984	16.000	16:0	1.43	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
10.743	498	0.038	0.985	16.226	15:0 2OH	0.46	ECL deviates 0.007	
11.230	859	0.039	0.985	16.508	15:0 3OH	0.79	ECL deviates 0.005	
11.441	434	0.045	0.986	16.630	17:0 ISO	0.40	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
11.601	1453	0.039	0.986	16.723	17:0 ANTEISO	1.34	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
13.884	685	0.038	----	18.028		----		
16.436	752	0.036	----	19.488		----		
----	541	----	----	----	Summed Feature 3	0.50	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

ECL Deviation: 0.002
 Total Response: 110560
 Percent Named: 98.35%

Reference ECL Shift: 0.002 Number Reference Peaks: 12
 Total Named: 108741
 Total Amount: 106741

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA40 4.10	0.700	Micrococcus-luteus-GC subgroup B*
	0.625	Micrococcus-lylae-GC subgroup A
	0.545	Micrococcus-luteus-GC subgroup C*

Abbildung 31: Liste der gefundenen Fettsäuren von Isolate jy312-9

Mit der Software Sherlock (Version 6.1) wurden die Fettsäurezusammensetzungen mit den Typstämmen in der MIDI-Datenbank verglichen und zusammen mit dem Typstamm mit der größten Ähnlichkeit aufgelistet. Das Isolat jy312-9 wurde als *Micrococcus luteus* identifiziert.

Durch die Fettsäureanalyse konnten 14 Isolate identifiziert werden. Die Identifizierung von 12 Isolaten wurde durch die MALDI-Methode und die Analyse der 16S rRNA Gensequenzen bestätigt.

Bestimmen der Diaminopimelinsäure (DAP)

Eine weitere chemotaxonomische Methode ist das Bestimmen der Diaminopimelinsäure. 12 Isolate wurden mit dem DAP-Test untersucht und in drei Gruppen geteilt: Isolate mit LL-DAP, mit meso-DAP und ohne DAP.

Folgende Actinomyceten haben LL-DAP in der Zellwand: die Familien *Nocardioidaceae*, *Sporychthiaceae*, *Streptomycetaceae* mit den Gattungen *Streptomyces*.

Von den vier Isolaten mit LL-DAP wurden drei auf der Basis der MALDI-Analyse als *Streptomyces* sp. identifiziert. Die Analyse der 16S rRNA bei den drei Isolaten bestätigte die Zuordnung. Das Isolat Jun-1 wurde molekularbiologisch als *Streptomycetaceae bacterium* CNQ719 identifiziert.

Zu den Bakterien mit meso-DAP gehörten die Gram-negativen und einige Gram-positive Bakterien, wie die Gattung *Amycolatopsis*, *Dietzia*, *Micromonospora* und die Familien *Nocardiopsaceae* usw.

Zwei Isolate mit meso-DAP wurden mittels MALDI-TOF MS als *Dietzia natronolimnaea* und *Micromonospora* sp. identifiziert. Die anderen zwei wurden den Gram-negativen Bakterien *Pseudomonas nitroreducens* und *Moraxella osloensis* zugeordnet. Die Ergebnisse wurden mit der Analyse der 16S rRNA bestätigt.

Vier Isolate ohne DAP wurden als *Promicromonospora umidemergens*, *Microbacterium testaceum*, *Micrococcus luteus* und *Paenibacillus mendelii* detektiert. Bei diesen Isolaten stimmte die Zuordnung mittels der MALDI-Methode mit der molekularbiologischen überein.

3.6.3.3 MALDI Ergebnisse von Isolaten

44 Isolate wurden mittels MALDI-TOF MS wie in 2.9.2.3.4 beschrieben analysiert. Davon wurden 41 bis zur Gattungsebene (Score bei 1,7 - 2,0) beziehungsweise Speziesebene (Score > 2,0) identifiziert. 24 Isolate wurden ausgewählt, deren chemotaxonomische Merkmale und Ergebnisse der Analyse der 16S rRNA und MALDI in Tabelle 20 gezeigt werden.

3.6.3.4 16S Sequenzierung

Die Sequenzierung der 16S rRNA ist eine molekularbiologische Methode zur Identifizierung von Bakterienisolaten. 16S-Sequenzierung wurde mit ausgewählten 20 Isolaten wie in 2.9.3 beschrieben durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen ist der Tabelle 20 zu entnehmen. Die Sequenzen der Isolate stimmten mehr als 97% mit den 16S rRNA-Sequenzen der NCBI Datenbank überein. Die Sequenzen befinden sich im Anhang.

Tabelle 20: Identifizierung der Isolate

Stamm_Nr.	DAP	Fettsäure	Taxon MIDI*	Taxon 16S r RNA_Gen**		Taxon MALDI***	
				nächste Verwandet	Ähnlichkeit	Resultat des Vergleichs	Score
jy311_3	ohne	A, I, S, OH	No match	<i>Promicromonospora</i> sp. 09-Be-007	100%	<i>Promicromonospora umidemergens</i>	1,913
jy311-5	ND	T, S, U	No match	ND	-	<i>Dietzia natronolimnaea</i>	1,916
jy311_15	ohne	A, I, S, OH	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium testaceum</i> Strain SE017	99%	<i>Microbacterium testaceum</i>	1,977
jy311_17	ND	A, I, T, OH	No match	<i>Streptomyces tubercidicus</i> strain 14241	98%	No match	-
jy311_18	ND	A, I, T, OH	No match	<i>Streptomyces tubercidicus</i> strain 14241	99%	No match	-
jy311_21	ND	A, I, T	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces tubercidicus</i> strain 5US-2	99%	No match	-
jy311_22	meso	T, S, U	No match	<i>Dietzia natronolimnaea</i> Strain TPL19	99%	<i>Dietzia natronolimnaea</i>	1,922
jy311_23	ND	A, I, T	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces pactum</i> Strain NRRL ISP-5530	98%	<i>Streptomyces avidinii</i>	1,801
jy311_24	ND	A, I, T	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces tubercidicus</i> strain 5US-2	99%	<i>Streptomyces viridosporus</i>	1,754
jy311_25.2	ND	A, I, U	<i>Bacillus lentimorbus</i>	ND	-	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i>	2,162
jy311_26.2	ND	A, I, U	<i>Bacillus lentimorbus</i>	ND	-	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i>	1,889
FH 7056	LL	A, I, T, S	No match	<i>Streptomyces tubercidicus</i> strain 5US-2	99%	<i>Streptomyces avidinii</i>	1,793
FH 7057	LL	A, I, T, S	No match	<i>Streptomyces tubercidicus</i> strain 5US-2	99%	<i>Streptomyces avidinii</i>	1,761
FH 7060	LL	A, I, T, S, OH	No match	<i>Streptomyces pactum</i> Strain NRRL ISP-530	98%	<i>Streptomyces avidinii</i>	1,705
Jun_1	LL	A, I, T, S	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomycetaceae bacterium</i> CNQ719	99%	No match	-

Stamm_Nr.	DAP	Fettsäure	Taxon MIDI*	Taxon 16S r RNA_Gen**		Taxon MALDI***	
				nächste Verwandet	Ähnlichkeit	Resultat des Vergleichs	Score
jy312_2	ohne	A, I	No match	<i>Paenibacillus mendelii</i> Strain C/2=CCM 4839	97%	<i>Paenibacillus mendelii</i>	2,049
jy312_5	meso	OH, U	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	99%	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	2,263
jy312_8	meso	OH, U	<i>Moraxella osloensis</i>	<i>Moraxella</i> sp. D30C2A	99%	<i>Moraxella osloensis</i>	1,892
jy312_9	ohne	A, I	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665	99%	<i>Micrococcus luteus</i>	2,131
jy312_10	meso	A, I, T	No match	<i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC 27029	99%	<i>Micromonospora</i> sp.	1,81
jy312_17	ND	A, I, U	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. G296-78	99%	<i>Paenibacillus</i> sp.	2,326
jy313_18	ND	A, I	<i>Microbacterium</i> , <i>Nesterenkonia</i>	<i>Nesterenkonia</i> sp.AN1	99%	<i>Nesterenkonia jeotgali</i>	2,317
jy313_22	ND	A, I	<i>Kocuria kristinae</i>	<i>Nesterenkonia</i> sp.AC84	99%	<i>Nesterenkonia</i> sp.	1,949
jy313_25	ND	A, I, U	<i>Bacillus lentimorbus</i>	ND	-	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i>	1,861

*Identifizierung durch MIDI-Software, no match: keine Zuordnung zu Taxa; **Identifizierung anhand des 16S rRNA-Gens, ND: nichtuntersucht;

***Identifizierung mit BioTyper 2.0 Software.

Abkürzungen der Fettsäuren: S - gradkettig, gesättigt, U - einfach ungesättigt, A - anteiso-methyl-verzweigt, I - Iso-methyl-verzweigt, T - 10-Methyl-verzweigt (Tuberculoctearinsäure), OH - hydroxyliert.

3.6.4 DGGE (Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese)

Die DGGE wurde durchgeführt, um eine kultivierungsunabhängige Methode als Vergleichsmethode heranziehen zu können.

Bei der DGGE wurden die PCR-Produkte der DNA, die aus den vorbereiteten Baumaterialproben direkt extrahiert wurden, aufgetragen (siehe 2.9.3). Mit den universal bakteriellen Primern GC-341f und 907r ergaben verschiedenen Proben Bandmuster. In Abbildung 32 wurden die bakteriellen Diversitäten der Materialproben dargestellt.

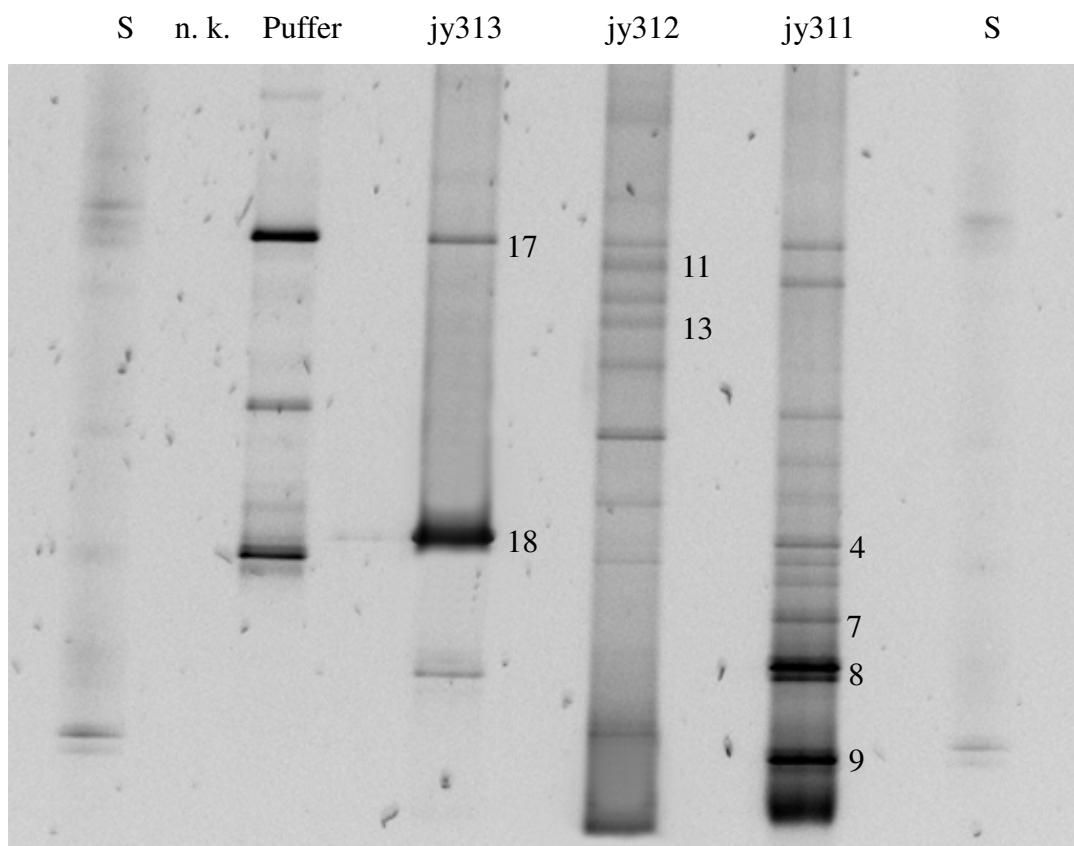


Abbildung 32: DGGE der bakteriellen Gemeinschaften von Baumaterialproben

Von links bis rechts: Standard (S), n.k.: negative Kontrolle, Puffer, Probe jy313, jy312 und jy311 und Standard. Die nummerierten Banden wurden sequenziert.

Es wurden drei Proben, Puffer, negative Kontrolle und ein DGGE-Standard im Gel aufgetrennt. Der Puffer bezog sich auf die Pepton-Salz-Lösung, die bei der Probenvorbereitung verwendet wurde. Beim Vergleich der Bandmuster von verschiedenen Proben waren Unterschiede deutlich zu erkennen. Dies bestätigt die MALDI und Kultivierungsergebnisse.

Um die Zusammensetzung von bakteriellen Gemeinschaften zu ermitteln, wurden die Banden ausgeschnitten und die DNA-Fragmente sequenziert. Aus den Banden für den Puffer wurden

keine Sequenzen gewonnen. Bei einigen DGGE-Banden konnte nicht sequenziert werden, da die Banden mehrere DNA-Fragmente hatten. Ein nächster Schritt wäre hier gewesen, solche Banden mit einer Klonierung zu separieren und zu sequenzieren, welches aus zeitlichen Gründen aber nicht durchgeführt werden konnte.

Daher wurden die eindeutigen DGGE-Sequenzen mit den Einträgen der NCBI-Datenbank verglichen und die Ergebnisse in Tabelle 21 aufgelistet.

Tabelle 21: Vergleich der DGGE-Sequenzen mit den Einträgen der NCBI-Datenbank

Phylotyp	Banden	Assession-Nummer	nächste Verwandte	Ähnlichkeit
jy311	4	gb FJ210720.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain C90	99%
	7	embl AJ415379.1	<i>Brachybacterium fresconis</i>	99%
	8	gb EF459545.1	<i>Brevibacterium antiquum</i> isolate KFC-74	99%
	9	dbj AB473555.1	<i>Streptomyces</i> sp. Sp080513SC-30	99%
jy312	11	gil296999687 gb HM306092.1	Uncultured bacterium clone ncd860g06c1	94%
	13	gil296999697 gb HM306102.1	Uncultured bacterium clone ncd860d12c1	98%
jy313	17	gb FJ593728.1	Uncultured bacterium clone 298EGG26	99%
	18	gil306035148 gb HM854253.1	<i>Bacillus atrophaeus</i> strain KNA-7	99%

Bei jy311 wurden vier Gattungen *Bacillus*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium* und *Streptomyces* gefunden. Die Sequenzähnlichkeit der DGGE-Banden mit den 16S rRNA-Sequenzen der NCBI-Datenbank beträgt 99%. Bei Probe jy312 wurde zwei DGGE-Sequenzen als unkultiviertes Bakterium identifiziert, die bisher nur als Klone vorlag. Bei jy313 wurden *Bacillus* und ein unkultiviertes Bakterium detektiert. Alle weiteren Banden außer Bande 11 hatten mit Sequenzen in der NCBI-Datenbank mehr als 98% Ähnlichkeit. Die Sequenzähnlichkeit der Bande 11 mit dem unkultivierten Bakterium Klon ncd860g06c1 beträgt nur 94%. Die Bande weist auf ein neuens unkultiviertes Bakterium hin.

4 Diskussion

In den letzten Jahren wurde die MALDI-TOF Massenspektrometrie als ein taxonomisches Verfahren zur Klassifizierung von Bakterien rasch etabliert (Welker, 2011). Die vorliegende Arbeit leistet dabei einen Beitrag zur zuverlässigen Charakterisierung von bakteriellen Gemeinschaften unter Einsatz dieser Technik.

Die verschiedenen Versuche wurden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durchgeführt. Bei Letzterem wurden verschiedenen Mischkulturen aus Ribosomen oder Zellextrakten mit MALDI-TOF Massenspektrometrie untersucht, um Einsatzmöglichkeiten bzw. etwaige Einflussfaktoren der MALDI-Methode auf Mischkulturen zu ermitteln. Zusätzlich wurde der Einfluss von Nährmedien beobachtet und interessante Peaks mit MALDI TOF/TOF MS analysiert. Außerdem wurden die Anwendungsbereiche dieser MALDI-Analyse getestet, anhand im Labor hergestellter mikrobieller Gemeinschaften, die sich aus definierten Stämmen zusammensetzten. *In vivo* wurden die Wasserproben aus dem Westerhöfer Bach, die mit einer Milchzentrifuge vorbereitet wurden, direkt mittels MALDI-TOF MS analysiert. Da keine eindeutigen Ergebnisse gewonnen werden konnten, wurden anschließend *Flavobacterium*-Typstämme und Isolate aus Wasserproben mit der MALDI-Methode klassifiziert. Dann wurde die MALDI-Methode bzgl. Proben aus Bakteriengemeinschaften eingesetzt, die aus einem Innenraum mit Feuchteschäden isoliert wurden. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden diese Proben parallel mit kultivierbaren und molekularbiologischen Methoden klassifiziert.

4.1 Erfolgreiche Differenzierung der Mischkulturen

Zuerst wurden Zellextrakt und die isolierten Ribosomen von *E. coli* in MALDI-TOF MS untersucht (siehe 3.3.1). Die Ergebnisse stimmten mit einer Studie von *E. coli* Ribosomen (Arnold & Reilly, 1999) überein. Durch Vergleich der beiden MALDI-Spektren wurde festgestellt, dass die meisten Signale des Zellextrakts durch die Ribosomen geliefert werden (Tab. 9). Die ribosomalen Proteine wurden bereits als Biomarker für die MALDI-Analyse von *Lactobacillus plantarum* (Sun *et al.*, 2006), *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Teramoto *et al.*, 2007a) eingesetzt.

In der Arbeit wurden die Mischungen der Ribosomen anstelle der intakten Zellen als Modell untersucht und daraus schließlich genaue Ergebnisse hinsichtlich der Identifizierungen erhalten; zudem wurde die Komplexität der gemischten Probe dadurch reduziert. Letzteres

war erforderlich, um die Anwendbarkeit und Einschränkungen der MALDI-TOF Massenspektrometrie für die Analyse von bakteriellen Mischkulturen zu prüfen.

Die Analysen der Ribosomen- und Zellmischungen zeigten, dass bei den mikrobiellen Mischkulturen bis zu 6 Stämme auf ribosomaler Ebene mittels MALDI-TOF Methode differenziert werden konnten (siehe 3.3.3). Dies bedeutet, dass die MALDI-TOF Massenspektrometrie das Potenzial hat, Bakteriengemeinschaften zu charakterisieren.

Im Jahre 2002 wurden im Labor hergestellte Mischkulturen aus zwei bis vier Bakterien analysiert und deren Mitglieder in den meisten Fällen auf der Speziesebene identifiziert (Wahl *et al.*, 2002). Damals beinhaltete die verwendete Datenbank nur 32 Referenzspektren aus 8 verschiedenen Gattungen, während die aktuell eingesetzte Bruker Datenbank um Größenordnungen umfangreicher ist (> 3000 Spektren). Danach wurde die Mischung der intakten Zellen aus *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* von der Firma AnagnosTec (2008) identifiziert. In einer andere Studie wurden sechs Pathogene gemischt und mit der MALDI-Methode untersucht. Die einzelnen Stämme konnten visuell durch eigene spezifische Peaks identifiziert werden (Hsieh *et al.*, 2008). Weiterhin wurde in der Doktorarbeit von Büchel (2009) die MALDI-Analyse auf künstlichen Mischkulturen durchgeführt. Außerdem wurden die Mischungen aus Magen-Darm-Bakterien auf bis zu 13 Stämmen mit MALDI analysiert. Trotz der guten Qualität konnten die erhaltenen Spektren aufgrund der erhöhten Komplexität visuell nur schwer interpretiert werden (Van Hoorde *et al.*, 2010).

4.2 Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaften mit dem MALDI-BioTyper System

In der vorliegenden Arbeit wurden die bakteriellen Gemeinschaften aus dem Westerhöfer Bach und Baumaterialien aus Innenräumen erstmals mit dem MALDI-BioTyper System untersucht.

Zur Auswertung der Massenspektren von Bakteriengemeinschaften ist die Entwicklung einer speziellen Software notwendig. Im Jahre 2010 wurde eine neue Methode von der Firma Bruker entwickelt, die die Spektren von Mischkulturen aus zwei Bakterien effizient auswerten kann (Wenzel *et al.*, 2010). Allerdings steht für komplexere Mischkulturen oder Umweltproben momentan noch keine entsprechende Software zur Verfügung.

Da die in dieser Studie verwendete Software BioTyper 2.0 eigentlich für die Identifizierung von Isolaten verwendet wird, muss die Vorbereitung der Umweltprobe identisch zu der der Referenzspezies sein, um die Auswertungen mit dem BioTyper durchführen zu können.

Bei den Blindversuchen auf künstlichen Mischkulturen ist klar zu erkennen, dass die Bakteriengemeinschaften aus vier bis fünf Mikroorganismen mit dem MALDI-BioTyper System detektiert werden konnten (siehe 3.5).

Wasserproben aus Westerhöfer Bach

Laut früheren Studien sind Wasserproben aus dem Westerhöfer Bach sehr komplex, da dort mehr als 900 Isolate in Proben gefunden wurden (Brambilla *et al.*, 2007, Cousin *et al.*, 2008). Diese Erwartung bestätigte sich, da die Wasserproben mit dem MALDI-BioTyper System nicht erfolgreich charakterisiert werden konnten (siehe 3.1). Die Komplexität dieser Wasserproben übersteigt hier offensichtlich die Grenzen der vorgestellten Techniken.

Baumaterialienproben aus Innenräume

Im Vergleich zu den Wasserproben beinhalteten die Baumaterialproben aus Innenräume deutlich weniger Bakterienarten.

Die Kultivierung der Bakterien von Baumaterialien mit Feuchtschäden ist ein aufwendiger Prozess, da die Zusammensetzung aus Bakterien und deren Lebensbedingungen ganz unterschiedlich sind. Das Erhalten von Reinkulturen dauerte dabei mehr als 30 Tage. Da DGGE eine der häufigsten bei der Diversitätsanalyse von bakteriellen Gemeinschaften verwendete molekularbiologische Methode ist (Heuer & Smalla, 1997; Zhang *et al.*, 2011), wurde sie als Vergleich eingesetzt. Zunächst wurde die DGGE bei Analysen von Baumaterialproben angewandt, wobei die Durchführung ca. 5 Tage benötigte. Im Vergleich dazu wurden die Umweltproben ohne Vorselektion direkt mit dem MALDI-BioTyper System innerhalb von nur zwei Tagen analysiert.

Mit diesen Methoden wurden in drei Proben insgesamt 21 Gattungen sowie drei unkultivierbare Bakterien detektiert (Tab. 22). Obwohl die Materialtypen identisch waren, zeigten sich unterschiedliche Bakterien-Zusammensetzungen. Dies konnte durch die verschiedenen Bandenmuster in den DGGE-Gel-Analysen bestätigt werden (Abb. 32).

Tabelle 22: Vergleich von MALDI / DGGE / Isolate

	MALDI für Mischung	DGGE	Isolate
jy311	<i>Actinomadura</i> *	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>
	<i>Arthrobacter</i> *	<i>Brachybacterium</i>	<i>Dietzia</i>
	<i>Brachybacterium</i> *	<i>Brevibacterium</i>	<i>Microbacterium</i>
	<i>Microbacterium</i> *	<i>Streptomyces</i>	<i>Promicromonospora</i>
	<i>Streptomyces</i> *		<i>Streptomyces</i>
jy312	<i>Amycolatopsis</i>	Zwei unkultivierbare Bakterien	<i>Bacillus</i>
	<i>Lactobacillus</i>		<i>Paenibacillus</i>
	<i>Neisseria</i>		<i>Pseudomonas</i>
	<i>Nocardiopsis</i>		<i>Micrococcus</i>
	<i>Pseudomonas</i>		<i>Micromonospora</i>
			<i>Moraxella</i>
jy313	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>
	<i>Brevibacterium</i>	Ein unkultivierbares Bakterium	<i>Nesterenkonia</i>
	<i>Corynebacterium</i>		

Die mittels von drei Methoden detektierten Gattungen sind rot markiert. Die mittels von zwei Methoden identifizierten Gattungen sind gelb markiert. *Nur hinsichtlich der *Actinomyceten*-Datenbank ausgewertet.

Es gibt nur wenige umfangreiche Untersuchungen zu Bakterien aus Innenräumen. In den meisten Fällen wurden neu entdeckte Arten beschrieben. In der quantitativen Erfassung wurden Actinomyceten als eine relevante Bakteriengruppe ermittelt (Hyvärinen *et al.*, 2002, Lorenz *et al.*, 2003). Die Actinomycetengattungen *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Nocardiopsis*, *Micrococcus* und *Rhodococcus* wurden in wassergeschädigten Baumaterialien isoliert (Andersson *et al.*, 1997, 1999). Weitere Gattungen wie *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Clavibacter*, *Dietzia*, *Microbacterium*, *Promicromonospora*, *Pseudonocardia*, *Spirillospora*, *Streptosporangia* und *Thermomonospora* wurden in Innenräumen detektiert (Peltola, 2001). Mit kultivierungsunabhängigen Analysen wurde festgestellt, dass die bakteriellen Gemeinschaften in Innenräumen komplex und von Actinomyceten und *Firmicutes* dominiert werden (Rintala *et al.*, 2008). Suihko *et al.* (2009) zeigten unter Anwendung von Kultivierung, Riboprinting und 16S-Sequenzierung, dass die Gattungen *Streptomyces*, *Thermoactinomyces*, *Laceyella*, *Nocardiopsis*, *Pseudonocardia* und *Saccharomonospora* detektiert wurden. In einer umfangreichen Studie wurden 68 Gattungen von *Actinobacteria* mit kultivierungsabhängigen und molekularbiologischen Methoden nachgewiesen. Darin wurden *Amycolatopsis*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Nocardiopsis*, *Pseudonocardia*, *Promicromonospora*, *Saccharopolyspora* und *Streptomyces* als am häufigsten vorkommende Gattungen in durch Feuchtigkeit geschädigten Baumaterialien ermittelt (Kämpfer *et al.*, 2009). Die in den Proben durch drei Methoden nachgewiesene Gattung *Streptomyces* wurde auch von anderen Autoren beschrieben

(Andersson *et al.*, 1999; Grigorevski-Lima *et al.*, 2006; Roponen *et al.*, 2001; Schäfer *et al.*, 2010a). Außerdem wurde die Dominanz der *Proteobacteria* in der Luft von mehreren Studien nachgewiesen (Fahlgren *et al.*, 2010; Fierer *et al.*, 2008).

Im Vergleich zur Literatur sind die mit drei Methoden detektierten 21 Gattungen als Besiedler von Baumaterialien mit Feuchteschäden bekannt. Mit der MALDI-Technik wurden 12 dieser Gattungen (57%) detektiert, davon wurden vier Gattungen auch durch andere Methoden in derselben Probe erfasst.

Zusammengefasst bedeutet dies, dass das MALDI-BioTyper System nur ein Teil der vorhandenen Bakterien in Umweltproben identifizieren konnte.

4.3 Vorteile

4.3.1 Schnelligkeit und einfache Probenvorbereitung

Für die traditionellen Techniken in der Taxonomie wird eine Reinkultur der zu identifizierenden Mikroorganismen aus einer Probe benötigt. Dieser Vorgang ist komplex und dauert oft mehr als 72 Stunden. Die Isolierung der langsam wachsenden Bakterien benötigt sogar 7 bis 10 Tage. Außerdem sind die weiteren Verfahren zur Identifizierung von Bakterien zeitaufwendig. Die molekularbiologischen Techniken wie z. B. *Polymerase chain reaction* und DGGE sind zur Charakterisierung zwar hoch effizient, aber auch zeitintensiv.

Im Gegensatz dazu liegt der wesentliche Vorteil der MALDI-TOF Methode in der schnellen Durchführung. Die heute verwendeten Protokolle und Software erfordern Reinkulturen, so dass die Bakterien erst nach vorangegangener Kultivierung identifiziert werden können, was die Gesamtdurchführungszeit wiederum erhöht. In der vorliegenden Arbeit wurden die Primärmaterialien durch eine einfache Probenvorbereitung für MALDI-TOF MS direkt verwendet (siehe 3.6.2). Die verschiedenen biologischen Materialien oder Umweltproben können ohne Vorselektion gleichwertig analysiert und die Ergebnisse für eine Analyse einzelner Proben innerhalb weniger Minuten erzielt werden. Die Schnelligkeit der MALDI-Methoden ist bei der nosokomialen Infektion oder Epidemie entscheidend, um das Risiko eines Schadens für die öffentliche Gesundheit zu minimieren.

Darüber hinaus wurde ein Stressprotein – säureschock-induzierbares periplasmisches Protein – näher untersucht (siehe 3.4). Dieses Protein und die dafür verantwortlichen *asr* Gene wurden mit einer molekularbiologischen Methode zeit- und arbeitsintensiv entdeckt (Sužiedėlienė *et al.*, 1999). Im Vergleich dazu wurden die Peaks des Proteins mittels der MALDI-Methoden in drei Tagen detektiert, identifiziert und ermöglichten somit im Vergleich

eine deutlich schnellere Durchführung.

4.3.2 Geringere Kosten

Die herkömmlichen Verfahren, insbesondere die molekularen Techniken erfordern hochwertige Instrumente, teure Reagenzien und entsprechende Software. Zusätzlich fallen bei Verwendung von chemotaxonomischen und molekularbiologischen Methoden zur Identifizierung von Mikroorganismen hohe Arbeitskosten an.

Neben den hohen Investitionskosten, sind die laufenden Kosten der MALDI-Technik entscheidend geringer als die anderer Methoden wie z. B. Ribotyping, PCR, usw. Aufgrund der geringen Kosten können alle Proben gleichwertig analysiert werden.

4.3.3 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit basiert auf einer Reihe reproduzierbarer Peaks im Messbereich, die als Fingerprints verwendet werden können (Saenz *et al.*, 1999). Diese Peaks gehen meistens von ribosomalen Proteinen aus.

Einige Studien berichteten, dass die auf verschiedenen Nährmedien gezüchteten Bakterien unterschiedliche Spektren ergeben hatten (Walker *et al.*, 2002; Ruelle *et al.*, 2004; Valentine *et al.*, 2005). In dieser Arbeit wurden solche Phänomene ebenfalls beobachtet (siehe 3.4). Conway *et al.* (2001) berichtet, dass die Massenspektren, der in zwei verschiedenen Nährmedien gewachsenen *E. coli* Stämme 80% Ähnlichkeit hatten. Das bestätigt auch die Ergebnisse in der Arbeit. Obwohl die unterschiedlichen Nährmedien und Wachstumsphasen großen Einfluss auf die Peakmuster von *E. coli* hatten, wurden die Spektren mit dem BioTyper System immer *E. coli* zugeordnet.

Nach dem Einhalten von standardisierten Probenvorbereitungen und automatisierten Messungen sind die Massenspektren der gleichen Proben auf verschiedenen MALDI-Geräten fast identisch. Die Spektren des MALDI-TOF Massenspektrometers können verwendet werden, um eine echte und zuverlässige Datenbank einzurichten. Die Ergebnisse aus verschiedenen Laboren sind vergleichbar.

Bei zunehmender Zahl der gemischten Bakterien wurden die Probe immer heterogener, was zu Schwierigkeiten bei den Messungen führte. Trotzdem waren die erhaltenen Spektren reproduzierbar.

4.4 Vergleich der Auflösungsvermögen von MALDI-TOF und anderen Methoden

4.4.1 Vergleich von MALDI-TOF, morphologischen, chemotaxnomischen und molekularbiologischen Identifizierung der Isolate

Die morphologische Charakterisierung reichte für eine zuverlässige Art-Identifizierung nur begrenzt aus; sie würde eine Vorselektion der Isolate für weitere Bestimmungen mit verschiedenen Methoden ermöglichen.

Zur Identifizierung der Isolate wurden MALDI-TOF Analysen, die Fettsäureanalyse und 16S-rRNA-Sequenzierung in der Arbeit verwendet. Die drei Methoden sind effektive Methoden und liefern zuverlässigen Ergebnisse. Je nachdem wie umfassend die Datenbank mit Referenzstämmen ist, kann ein Bakterium zur richtigen Gattung oder Spezies zugeordnet werden. Ein weiterer Kritikpunkt der drei Methoden ist, dass ein unbekanntes Isolat nur identifiziert werden kann, wenn die entsprechenden Referenzeinträge in der Datenbank vorhanden sind. Zwar kann das Isolat zu nah verwandten Referenzstämmen gruppiert werden, aber es ist dadurch noch keine exakte Identifizierung.

Wegen dem Fehlen der Referenzträger konnten die meisten Isolate durch Fettsäureanalysen nicht zugeordnet werden (Tab. 20). Die Identifizierung von Fettsäureanalysen basiert auf dem Vergleich von Fettsäure-Mustern, die von der lebenden Zelle produziert werden. Ungünstige pH-Werte, Temperatur und verfügbare Nährstoffe können zu starker Veränderung der Muster führen (Lambert & Moss, 1983; Nunes *et al.*, 1992). Diese Muster schwanken auch in Abhängigkeit verschiedener Wachstumszeiten (Sasser, 1990). Um reproduzierbare Spektren zu erhalten, müssen die Teststämme streng nach standardisierten Versuchs- und Wachstumsbedingungen angezüchtet werden (Henis *et al.*, 1996).

Im Vergleich zur Fettsäureanalyse stellen, hinsichtlich der Art-Identifizierung, molekularbiologische Methoden und MALDI-TOF eine höhere Auflösung dar (Tab. 20).

Heutzutage werden molekularbiologische Methoden (DDH, 16S-Sequenzierung und MLSA) am Häufigsten zur taxonomischen Identifizierung verwendet. Die exponentiell anwachsenden Sequenzdatenbanken und ständig optimierten Sequenzieretechniken erlauben die Identifizierung unbekannter Isolate (Woese, 1987; Stackebrandt & Göbel, 1994; Ludwig & Klenk, 2001). Die unkultivierbaren Bakterien können auch mit dieser Methode analysiert werden. Leider sind die molekularbiologischen Methoden arbeitsaufwändig und anfällig für Störfaktoren (z. B. DNA-Verunreinigungen). Der Vergleich der verschiedenen Sequenzen führt dabei zu unterschiedlichen Dendrogrammen (Gao & Gupta, 2005).

In der Literatur wird mehrmals darauf hingewiesen, dass die MALDI-TOF MS die zuverlässige Identifizierung bis auf Spezies- oder sogar Subspezies-Ebene erlaubt (Claydon *et al.*, 1996; Giebel *et al.*, 2008; Lasch *et al.*, 2008; Siegrist *et al.*, 2007; Vargha *et al.*, 2006). Die Charakterisierung der MALDI-TOF beruht auf der Analyse der Proteinmuster, die meistens von ribosomalen Proteinen stammen (Abb. 14). Aufgrund der Korrelation zwischen den Sequenzen und der für sie codierenden DNA ähnelt die MALDI-Identifizierung der 16S-Sequenzierung. Dies bestätigt die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (siehe 3.2, Tab. 20). Der Vergleich der *Flavobacteria*-Stammbäume von MALDI und 16S-Sequenzierung zeigte, dass die beiden Methoden Übereinstimmungen in Bezug auf die klare Trennung von Typstämmen und auf die Cluster von sehr ähnlichen genomischen und phänotypischen Isolaten besitzen (Abb. 12). Ausnahmen sind vier *Streptomyces*-Isolate, die mit dem MALDI-BioTyper System nicht identifiziert werden konnten (Score < 1,7), weil die Referenzspektren von *Streptomyces* in der Bruker Datenbank noch lückenhaft waren. Vorteil der MALDI-Methode ist, dass neue Referenzspektren jederzeit in die Datenbank eingefügt werden können.

Andererseits werden die Proteinmuster der MALDI-TOF von lebenden Gesamtzellen produziert und sind nicht anfällig gegen die Änderung im Stoffwechsel. In den Stammbäumen besaßen die Isolate, deren partielle 16S-rRNA-Gensequenz einen geringeren Unterschied als 2 % hatten, weniger als 20% Divergenz in den MALDI-TOF Spektren. Die MALDI-TOF MS ist sensibler als die 16S-Sequenzierung (Dickinson, 2004). In einer Analyse wurde gezeigt, dass die auf ribosomalen Profilierungen basierten MALDI Stammbäume mit denen auf der Teilsequenz der *gyrB*-Gene sehr vergleichbar sind (Teramoto *et al.*, 2007b). Die Auflösung von MALDI-TOF MS ist gleich hoch wie MLSA (Svensson *et al.*, 2010).

Im Vergleich zur morphologischen, chemotaxonomischen Methode und 16S-Sequenzierung stellt MALDI-TOF MS für die Identifizierung der Isolate ein Verfahren mit hohem Auflösungsvermögen dar.

4.4.2 Vergleich der MALDI-BioTyper System mit Isolierung und DGGE

Mit verschiedenen Methoden können unterschiedliche Bakterien detektiert werden. Dies bestätigt die Untersuchung der Baumaterialproben (Tab. 22). In 21 Gattungen wurden 7 Gattungen (33%) nur mittels MALDI-BioTyper, 8 Gattungen (38%) nur durch Isolierung und 6 Gattungen (29%) mit mindestens zwei Methoden erfasst. Mit DGGE wurden drei unkultivierbare Bakterien detektiert (siehe 3.6.4).

Diese unterschiedliche Nachweisbarkeit kann durch Fehlerquellen der jeweiligen Methode erklärt werden.

Die Nachweisbarkeit von Bakterien mittels kultivierungsabhängiger Methoden wird durch die Lebensfähigkeit und Kultivierbarkeit der Mikroorganismen beschränkt. Bei älteren Feuchteschäden mit geringen Wassergehalten können die Bakterien zwar leben aber sind u. U. nicht mehr kultivierbar. Gleichzeitig sollten die Nährmedien sorgfältig für die Kultivierung und Subkultivierung ausgewählt werden. Andere Studien von Bakterien im Innenraum zeigten, dass die Kultivierbarkeit der Bakterien zwischen 0,03-100% variiert, die von der Sammelmethode und der Spezies abhängig ist (Toivola *et al.*, 2002; Rintala *et al.*, 2008). Die Anzahl der gefundenen Isolate steigt, wenn mehr Nährmedien verwendet und verschiedene Verdünnungsstufen eingesetzt werden (Schäfer *et al.*, 2010a). Um eine ausreichende Erfassung zu ermöglichen, sind umfangreiche morphologische und chemotaxonomische Kenntnisse und ein hoher Arbeitsaufwand notwendig.

Der molekularbiologische Ansatz ist durch den Faktor der DNA-Extraktionseffizienz begrenzt (Taylor *et al.*, 2002; Fallschissel *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA-Extraktion aus Umweltproben mit einem Extraktionskit durchgeführt und die Extraktionseffizienz lag hier bei 15,5 - 43,3% (Mumy & Findlay, 2004). Weiterhin sind die Effizienz der DNA-Extraktion bei verschiedenen Bakterien nicht gleich (Picard *et al.*, 1992). Es ist sehr wahrscheinlich, dass einiges der bakteriellen DNA bei diesem Schritt verloren geht. Bei der PCR müssen bekannte Primer vorliegen und die Polymerase muss anwendbar sein, um die Reaktion bei dem eventuell unbekannten Isolat durchzuführen (Wilkins & Lay, 2006). Die Vorselektion mit bestimmten Primern hat einen Einfluss auf die Nachweisbarkeit der Mikroorganismen (Schäfer *et al.*, 2010d). Die Auflösung von DGGE ist beschränkt, da nur etwa 1% der in bakteriellen Gemeinschaften vorhandenen Mikroorganismen detektiert werden können. Vorteil der DGGE ist die Ermittlung unkultivierbarer Bakterien aus Umweltproben.

Diese beiden Methoden sind zeit- und arbeitsaufwändig und in der Routine häufig nicht einsetzbar.

Die Limitierung von MALDI-TOF MS liegt im Fehlen einer geeigneten Software. Bei der Auswertungen der Mischspektren stellen die überlagernden Peaks ein großes Problem dar. Solche Peaks sind aufgrund einer unzureichenden Auflösung des Massenspektrometers (Peak 5382,57 Da in Abb. 15) und unterschiedlicher Proteine mit sehr ähnlichem Molekulargewicht aufgetreten (*E. coli* ribosomalen Protein L36 und *A. aurescens* L36). Mit der aktuellen Software sind Bakterien mit vielen überlagernden Peaks nicht nachweisbar. Für eine korrekte Differenzierung der Bakterien in mikrobiellen Gemeinschaften ist eine vollständige Datenbank entscheidend. Die Gattung *Bacillus* wurde in der direkten MALDI Untersuchung

gar nicht detektiert, weil die *Bacillus*-Sporen ganz andere MALDI-Spektren als *Bacillus*-Zellen produzieren. Die aktuelle Datenbank ist derzeit noch zu klein, um die komplizierten Umweltproben zu charakterisieren. Ferner exprimieren die Bakterien verschiedene Proteine, je nach den verschiedenen Lebensbedingungen. Es ist daher nicht überraschend, dass die in verschiedenen Lebensbedingungen wachsenden Bakterien unterschiedliche zusätzlichen Peaks produzieren. Um diese Fehlerquelle zu vermeiden, sollen die ribosomalen Peaks als Biomarker für die Analyse der Umweltproben verwendet werden.

Die Vorselektion mit Nährmedien oder Primern in kultivierungsabhängigen und -unabhängigen Methoden kann zur Fehlinterpretation führen. Im Vergleich dazu ist die Nachweisbarkeit der MALDI-TOF durch die fehlende Vorselektion beeinflusst, da nur einige dominante Bakteriengruppen detektiert werden können. Die Sensibilität der MALDI-TOF MS ist gleich oder sogar höher als die von DGGE (Van Hoorde *et al.*, 2010). Zur Erhöhung der Auflösung kann die Selektion bei der Auswertung durchgeführt werden. z. B. wurde die Probe „jy311“ sowohl mit Isolierung als auch DGGE analysiert und zeigte, dass *Actinobacteria* die dominanten Gruppen waren. Bei der MALDI-BioTyper Analyse lieferte eine Auswertung auf Grundlage der *Aktinomyceten*-Datenbank aussagekräftigere Ergebnisse als die gesamte Datenbank.

Zusammengefasst ist das MALDI-BioTyper System beim Analysieren der Blut-, Urin- oder Fermentproben, die weniger als fünf Bakterienarten beinhalten, gut einsetzbar. Aufgrund oben genannter Beschränkungen ist die direkte Anwendung der MALDI-TOF MS bei komplexen Umweltproben nur begrenzt möglich. Vermutlich kann eine komplexe Umweltprobe mit anderen Verfahren in kleinen Portionen mit maximal vier Bakterienarten aufgeteilt werden. Dann würde jede Portion mit MALDI-TOF direkt analysiert. Mit einer Cluster Analyse der gesamten Ergebnisse könnte die vollständige Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaften ermöglicht werden.

4.5 Einsatzgebiete

Klinische Diagnostik

Ziel der klinischen Diagnostik ist, die Erreger (Bakterien, Pilz, Parasiten) in Patientenproben zu identifizieren. Traditionelle Diagnostik basiert auf Kultivierung auf Agarplatten und biochemischen Aktivitätstests. In den letzten zwanzig Jahren wurden die PCR-basierten Methoden auch in der Diagnostik verwendet. Solchen Methoden sind kosten- und

arbeitsintensiv. MALDI-TOF MS ist eine zuverlässige, schnelle und kostengünstige Methode, die in der letzten Zeit auch in Routine-Diagnostik zur Differenzierung von Bakterien und Pilzen eingesetzt wird (Seng *et al.*, 2009; Marklein *et al.*, 2009; Van Veen *et al.*, 2010). Für die dabei verwendeten Protokolle ist die Kultivierung in einem Nährmedium erforderlich.

Die Untersuchungen in der vorliegenden Studie zeigten, dass MALDI-TOF MS Potenzial hat, relevante Krankenhauskeime aus Mischkulturen direkt nachzuweisen (Tab. 14). Seit kurzem wurden direkte Analysen mittels MALDI-TOF MS auf Blutkulturen oder Urinproben durchgeführt und dies größtenteils erfolgreich (Ferreira *et al.*, 2010; Vlek *et al.*, 2012). Dies ist bedeutsam, da die Direktnachweise der Erreger aus Patientenproben die Identifizierungszeit erheblich verringert. Etwa 500 Proben können in einem Tag mit einem einzigen Gerät untersucht werden. Die schnelle Identifizierung von solchen Bakterien ist entscheidend für den Klinikalltag: einerseits ermöglicht sie eine gezielte Behandlung, andererseits können die Morbidität und die Ausbreitung eines Pathogenen minimiert werden (Shetty *et al.*, 1998).

Besonders für die schlecht oder langsam wachsenden Bakterien hat die MALDI-TOF MS einen großen Einfluss auf die klinischen Diagnostik.

Lebensmittelhygiene

Lebensmittelinfektionen durch Bakterien sind eines der großen Probleme der Lebensmittelhygiene. Bei der Identifizierung der durch Lebensmittel übertragenen Bakterien sind die PCR-basierten Methoden nicht geeignet (Holland *et al.*, 1996). In einigen Studien wurde die MALDI-TOF MS angewendet, um Pathogene in Lebensmitteln von anderen Verunreinigungen zu differenzieren (Ochoa & Harrington, 2005; Mazzeo *et al.*, 2006).

Die Anwendungsmöglichkeiten von MALDI-Verfahren in diesem Bereich werden durch die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit bestätigt (Tab. 15-17). Die Schnelligkeit und niedrige Kosten der Methode ermöglichen dabei umfangreiche Analysen.

Dabei wird deutlich, dass die Datenbank von Verderberorganismen in Lebensmitteln besonders bei Getränken noch sehr lückhaften ist. Das Schließen dieser Lücken ist eine wichtige Aufgabe, die noch ansteht.

Im Rahmen eines Forschungsprojekts „Risikoanalyse im Flug - Differenzierung mikrobieller Kontaminaten in Getränken mit MALDI-TOF MS“ wird eine MALDI-TOF MS Datenbank für Verderberorganismen in alkoholfreien und Biermischgetränken derzeit in der TU München aufgebaut. (<http://www.wzw.tum.de/tmw/index.php?id=151>).

Umweltforschung

Umweltproben sind in der Regel komplizierter als klinische oder Fermenterproben. Die direkte Analyse mit MALDI-TOF MS bietet die Möglichkeit, die ursprünglichen Zusammensetzungen der bakteriellen Gemeinschaften in der Natur widerzuspiegeln.

Jedoch ist die Anwendung der MALDI-TOF MS für Umweltmikrobiologie begrenzt. Es leben schätzungsweise mehr als hunderte Millionen Bakterien auf der Erde, davon konnten bisher nur 12,476 isoliert, kultiviert und beschrieben werden (Euzéby, 1997). Die anderen Bakterien sind bisher unkultivierbar und mittels MALDI-Methoden nicht analysierbar. Die Anzahl der Bakterienspezies, die in der gegenwärtige Bruker Datenbank vorhandenen sind, ist noch geringer. Es ist sehr wahrscheinlich, dass unbekannte Proben aufgrund der Fehlenden Referenzspektren mit der MALDI-Methode nicht identifiziert werden können.

Die Datenbank kann schnell aufgebaut werden. Sobald neue Bakterienspezies durch Methoden wie die 16S Sequenzierung genau identifiziert werden, können diese Mikroorganismen sofort mittels MALDI-TOF MS untersucht und deren Massenspektren in der Datenbank für die zukünftige Identifikationen hinzugefügt werden.

Insgesamt ist MALDI-TOF MS ein leistungsfähiges Werkzeug in der Charakterisierung von bakteriellen Gemeinschaften. Die vorliegende Arbeit bietet eine theoretische Grundlage für eine breite Anwendungen durch den direkten Nachweis von Bakterien mit dem MALDI-BioTyper System.

4.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse liefern Ansatzpunkte für mögliche, weiterführende Entwicklungen.

Die Bruker Datenbank muss noch weiter aufgebaut werden; insbesondere die Verderberorganismen für die Lebensmittelindustrien und die Gattung *Streptomyces* sind noch lückenhaft. Bei dem Direktnachweis der Spezies von *Bacillus* in den Umweltproben wäre das Einfügen der Referenzspektren von *Bacillus*-Sporen in die Datenbank sehr hilfreich.

Zur Analyse der Bakteriengemeinschaften wird dringend die Entwicklung einer spezialisierten Software für die Spektren der Mischkulturen benötigt, damit die Identifizierung nicht von überlagernden Peaks und durch Umweltbedingungen hervorgerufene Peaks beeinflusst werden kann. Weiterhin soll die Vorbereitung von Umweltproben optimiert

und standardisiert werden. Außerdem müsste die MALDI-Methode weiter entwickelt werden, um quantitative Untersuchungen erfolgreich durchführen zu können.

Der Direktnachweis der Bakterien in Umweltproben erscheint eine lösbare Aufgabe zu sein, die in verschiedenen Bereichen wie z. B. der klinischen Diagnostik, der Kontrolle von Lebensmittelhygiene und Umweltmikrobiologie zum Tragen kommen kann.

5 Literaturverzeichnis

Abel, K., Schmertzing, H. de. & Peterson, I. (1962) Classification of microorganismen by analysis of chemical composition. *J. Bacteriol.* **85**, 1039-1044.

Ali, Z., Cousin, S., Frühling, A., Brambilla, E., Schumann, P., Yang, J*. & Stackebrandt, E. (2009) Description of *Flavobacterium rivuli* sp. nov., *Flavobacterium subsaxonicum* sp. nov., *Flavobacterium swingsii* sp. nov. and *Flavobacterium reichenbachii* sp. nov., isolated from a hard water rivulet. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 2610–2617. (*Y war druckfehler im Paper).

Altenburger, P., Kampfer, P., Makristathis, A., Lubitz, W. & Busse, H. J. (1996) Classification of bacteria isolated from a medieval wall painting. *J. Biotechnol.* **47**, 39-52.

Amann, R. I., Krumholz, L. & Stahl, D. A. (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172**, 762-770.

Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143-169.

Amato-Gauci, A. & Ammon, A. (2007) The First European Communicable Disease Epidemiological Report. European Centre for Disease Prevention and Control.

AnagnosTec (2008) MALDI-TOF/SARAMIS for Identification and Classification of Microorganisms in Clinical Diagnostics.

http://www.anagnostec.eu/fileadmin/user_upload/download/microbiology_feb2008.pdf

Andersson, M. A., Nikulin, M., Köljalg, U., Andersson, M. C, Rainey, F., Reijula, K., Hintikka, E. L. & Salkinoja-Salonen, M. (1997) Bacteria, Molds, and Toxins in Water Damaged Building Materials. *Appl Environ Microbiol* **63**, 387-393.

- Andersson, M. A., Weiss, N., Rainey, F. & Salkinoja-Salonen, M. S. (1999)** Dust borne bacteria in animal sheds, schools and children's day care centres. *J Appl Microbiol* **86**, 622-634.
- Arnold, R. J. & Reilly, J. P. (1999)** Observation of *Escherichia coli* ribosomal proteins and their posttranslational modifications by mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **269**: 105-112.
- Aslam, Z., Im, W.-T., Kim, M. K. & Lee, S.-T. (2005)** *Flavobacterium granuli* sp. nov., isolated from granules used in a wastewater treatment plant. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 747-751.
- Auch, A. F., von Jan, M., Klenk, H. P. & Göker, M. (2010)** Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Stand Genomic Sci* **2**: 117-134.
- Auschill, T. M., Arweiler, N. B., Netuschil, L., Brex, M., Reich, E. & Sculean, A. (2001)** Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Arch Oral Biol* **46**, 471-476.
- Banner, D. J., Krieg, N. R. & Steley, J. S. (2005)** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2th edition, Springer.
- Barbuddhe, S. B.; Maier, T., Schwarz, G., Kostrzewa, M., Hof, H., Domann, E., Chakraborty, T. & Hain, T. (2008)** Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 5402–5407.
- Bergey, D. H., Harrison, F. C., Breed, R. S., Hammer, B. W. & Huntoon, F. M. (editors) (1923)** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Bernardet, J.-F. & Bowman, J. P. (2005)** The genus *Flavobacterium*. In The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community, release 3.20. Edited by Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. & Stackebrandt, E. New York: Springer.

- Bernardet, J.-F., Segers, P., Vancanneyt, M., Berthe, F., Kersters, K. & Vandamme, P. (1996)** Cutting a Gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family Flavobacteriaceae, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (*basonym, Cytophaga aquatilis Strohl and Tait 1978*). *Int J Syst Bacteriol* **46**, 128–148.
- Blackwood, C. B., Marsh, T., Kim, S.-H. & Paul, E. A. (2003)** Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Data Analysis for Quantitative Comparison of Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 926–932.
- Bornehag, C. G., Blomquist, G., Gyntelberg, F., Järholm, B., Malmberg, G. P., Nordvall, L., Nielsen, A., Pershagen, G. & Sundell, J. (2001)** Dampness in buildings and health nordic interdisciplinary review of the scientific evidence on associations between exposure to ‘Dampness’ in buildings and health effects (NORDDAMP). *Indoor Air* **11**, 72–86.
- Bradford, M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Brambilla, E., Päüker, O., Cousin, S., Steiner, U., Reimer, A. & Stackebrandt, E. (2007)** High phylogenetic diversity of *Flavobacterium* spp. in a hardwater creek, Harz Mountain, Germany. *Org Divers Evol* **7**, 145–154.
- Büchel, J. (2009)** Massenspektrometrie-basierte Identifikation und Klassifizierung von humanpathogenen Bakterien. Dissertation Universität Heidelberg.
- Busse, H.-J., Denner, E. B. M. & Lubitz W. (1996)** Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *J. Biotechnol.* **47**, 3–38.
- Cain, T. C., Lubman, D. M. & Weber, W. J. Jr. (1994)** Differentiation of bacteria using protein profiles from matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **8**, 1026–1030.

Carbonnelle, E., Beretti, J., Cottyn, S., Quesne, G., Berche, P., Nassif, X. & Ferroni, A. (2007) Rapid identification of *Staphylococci* isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2156–2161.

Claydon, M. A., Davey, S. N., Edwards-Jones, V. & Gordon, D. B. (1996) The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry, *Nat. Biotechnol.* **14**, 1584–1586.

Colwell, R. R. (1970) Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *Journal Bacteriol.* **104**, 410–433.

Conway, G. C., Smole, S. C., Sarracino, D. A., Arbeit, R. D. & Leopold, P. E. (2001) Phyloproteomics: Species identification of Enterobacteriaceae using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 103–112.

Cousin, S., Päüker, O. & Stackebrandt, E. (2007) *Flavobacterium aquidurens* sp. nov. and *Flavobacterium hercynium* sp. nov., from a hard-water creek. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 243–249.

Cousin, S., Brambilla, E., Yang, J. & Stackebrandt, E. (2008) Culturable aerobic bacteria from the upstream region of a karst water rivulet. *Int Microbiol* **11**, 91–100.

Dahllöf, I. (2002) Molecular community analysis of microbial diversity. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 213–217.

DeLong, E. F., Wickham, G. S. & Pace, N. R. (1989) Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* **243**, 1360–1363.

Demirev, P. A., Ho, Y., Ryzhov, V. & Fenselau, C. (1999) Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. *Anal. Chem.* **71**, 2732–2738.

Demirev, P. A. & Fenselau, C. (2008) Mass spectrometry in biodefense, *J. Mass Spectrom.* **43**, 1441–1457.

Dickinson, D., Duc, M., Satomi, M., Winefordner, J., Powell, D. & Venkateswaran, K. (2004) MALDI-TOFMS compared with other polyphasic taxonomy approaches for the identification and classification of *Bacillus pumilus* spore. *J. Microbiol. Methods* **58**, 1-12.

Dieckmann, R., Helmuth, R., Erhard, M. & Malorny, B. (2008) Rapid classification and identification of salmonellae at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 7767–7778.

Du, Z., Yang, R., Guo, Z., Song, Y. & Wang, J. (2002) Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chem.* **74**, 5487–5491.

Erhard, M., von Döhren, H. & Jungblut, P. (1997) Rapid typing and elucidation of new metabolites of intact cyanobacteria using MALDI-TOF Mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **15**, 906-909.

Euzéby, J. P. (1997) List of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 590-592. Available from: <<http://www.bacterio.net>>.

Fahlgren, C., Hagstrom, A., Nilsson, D. & Zweifel, U. L. (2010) Annual variations in the diversity, viability, and origin of airborne bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 3015-3025.

Fallschissel, K., Jäckel, U. & Kämpfer, P. (2009) Direct detection of *Salmonella* cells in the air of livestock stables by Real-Time PCR. *Ann Occup Hyg* **53**, 859-868.

Ferreira, L., Sanchez-Juanes, F., Gonzalez-Avila, M., Cembrero-Fucinos, D., Herrero-Hernandez, A., Gonzalez-Buitrago, J. M. & Munoz-Bellido, J. L. (2010) Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight) mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 2110-2115.

Fierer, N., Liu, Z., Rodriguez-Hernandez, M., Knight, R., Henn, M. & Hernandez, M. T. (2008) Short-term temporal variability in airborne bacterial and fungal populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 200-207.

Fischer, G., Hollbach, N., Schmitz, C. & Dott, W. (2005) Luftgetragene Schimmelpilze in der Umwelt des Menschen – gesundheitliche Relevanz und Möglichkeiten der Risikobewertung. *Gefahrst Reinhalt Luft* **65**, 335–340.

Fischer, G. (2010) Biologische Gefährdung, In: *Schadstoffe in Gebäuden*, Erfassen bewerten, beseitigen. Gesamtverband Schadstoffsanierung GbR (Hrsg.) S: 241-254.

Fischer, S. G. & Lerman, L. S. (1983) DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **80**, 1579-1583.

Gao, B. & Gupta, R., (2005) Conserved indels in protein sequences that are characteristic of the phylum *Actinobacteria*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 2401-2412.

Gauze, G. F., Preobrazhenskaya, T. P., Sveshnikova, M. A., Terekova, L. P., Maksimova, T. S. (1983) Opredelitel' Aktinomycetov. Rody *Streptomyces*, *Streptoverticillium*. Chainia, Izd. Nauka, Moscow (in Russian).

Giebel, R. A., Fredenberg, W. & Sandrin, T. R. (2008) Characterization of environmental isolates of *Enterococcus* spp. by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Water Res.* **42**, 931–940.

Goodfellow, M. (1989) Suprageneric classification of *Actinomycetes*. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams, S.T., Shape, M.E. and Holt J.G. (Ed.), Williams and Wilkins, Baltimore Vol. **4**, 2333-2339.

Goodfellow, M. & Cross, T. (1984) Classification. In *The Biology of the Actinomycetes*. Eds., Goodfellow, M., Mordarski, M. & Williams, S. T., Academic Press, London. 7-164.

Grigorevski-Lima, A. L., Silva-Filho, R. G., Linhares, L. F. & Coelho, R. R. R. (2006) Occurrence of *actinomycetes* in indoor air in Rio de Janeiro, Brazil. *Build. Environ.* **41**, 1540-1543.

Guckert, J. B., Ringelberg, D. B., White, D. C., Hanson, R. S. & Bratina, B. J. (1991) Membrane fatty acids as phenotypic markers in the polyphasic taxonomy of methylophils within the *Proteobacteria*. *J Gen Microbiol* **137**, 2631-2641.

Haag, A. M., Taylor, S. N., Johnston, K. H. & Cole, R. B. (1998) Rapid identification and speciation of *Haemophilus* bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* **33**, 750-756.

Hain, T., Ward-Rainley, N., Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E. & Rainey, F. A. (1997) Discrimination of *Streptomyces albidoflavus* Strains based on the Size and Number of 16S-23S ribosomal DNA Intergenic Spacers. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 202-206.

Hancock, I. C. (1994) Analysis of cell wall constituents of Gram-positive bacteria. In Chemical Methods in Prokaryotic Systematics. Eds., Goodfellow, M. & Donnell, A. G. O'. 63-84. John Wiley, Chichester.

Haverinen, U., Husman, T., Pekkanen, J., Vahteristo, M., Moschandreas, D. & Nevalainen, A. (2001) Characteristics of moisture damage in houses and their association with selfreported symptoms of the occupants. *Indoor Built Environ* **10**, 83-94.

Henis, Y., Gould, J. & Alexander, M. (1966) Detection and Identification of Bacteria by Gas Chromatography. *App. Microbio.* **14**, 513-524.

Henz, S. R., Huson, D. H., Auch, A. F., Nieselt-Struwe, K. & Schuster, S. C. (2005) Whole-genome prokaryotic phylogeny. *Bioinformatics* **21**, 2329-2335.

Hettick, J. M.; Kashon, M. L., Slaven, J. E., Ma, Y., Simpson, J. P., Siegel, P. D., Mazurek, G. N. & Weissman, D.N. (2006) Discrimination of intact mycobacteria at the strain level: A combined MALDI-TOF MS and biostatistical analysis. *Proteomics*. **6**, 6416-6425.

Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., & Wellington, E. M. (1997) Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3233-3241.

Heuer, H. & Smalla, K. (1997) Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. In: Elsas Van, J. D., Trevors, J. T. & Wellington, E. M. H. (eds.): *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, New York, 353-373.

Horn, M. A., Ihssen, J., Matthies, C., Schramm, A., Acker, G. & Drake, H. L. (2005) *Dechloromonas denitrificans* sp. nov., *Flavobacterium denitrificans* sp. nov., *Paenibacillus anaericanus* sp. nov. and *Paenibacillus terrae* strain MH72, N₂O-producing bacteria isolated from the gut of the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1255-1265.

Holland, R. D., Wilkes, J. G., Rafii, F., Sutherland, J. B., Persons, C. C., Voorhees, K. J. & Lay, J. O. (1996). Rapid Identification of Intact Whole Bacteria Based on Spectral Patterns using Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization with Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 1227-1232.

Holben, W. E. & Harris, D. (1995) DNA-based monitoring of total bacterial community structure in environmental samples. *Mol. Ecol.* **4**, 627-31.

Hsieh, S., Tseng, C., Lee, Y., Kuo, A., Sun, C., Lin, Y. & Chen, J. (2008) Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS. *Mol. Cell Proteomics* **7**, 448-456.

Hugenholtz, P., Goebel, B., and Pace, N. (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* **180**, 4765-4774.

Hyvärinen, A., Meklin, T., Vepsäläinen, A. & Nevalainen, A. (2002) Fungi and actinobacteria in moisture-damaged building materials-concentrations and diversity. *Int. Biodeterior. Biodegrad* **49**, 27-37.

Jackson, K. A., Edwards-Jones, V., Sutton, C. W. & Fox, A. J. (2005) Optimisation of intact cell MALDI method for fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Microbiol. Methods* **62**, 273-284.

Jaspers, E. & Overmann, J. (2004) Ecological significance of microdiversity: identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysiologicals. *Appl Environ Microbiol* **70**, 4831-4839.

John, H. A., Birnstiel, M. L. & Jones, K. W. (1969) RNA-DNA hybrids at cytological level. *Nature* **223**, 582-587.

Kämpfer, P., Jäckel, U., Schäfer, J., Groth, I., Martin, K., Lorenz, W., Gabrio, T., Weidner, U., Miljanic, T., Fischer, G., Trautmann, Ch. & Dill, I. (2009) Untersuchungen zum Vorkommen und zur gesundheitlichen Relevanz von Bakterien in Innenräumen. Umweltbundesamt. Berlin.

Kämpfer, P., Schäfer, J., Lodders, N. & Busse, H.-J. (2010a) *Brevibacterium sandarkinum* sp. nov., isolated from a wall of an indoor environment. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 909-913.

Kämpfer, P., Schäfer, J., Lodders, N. & Martin, K. (2010b) *Murinocardiopsis flavida* gen. nov., sp. nov., a novel actinomycete isolated from indoor walls. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 1729-1734.

Karas, M. & Hillenkamp, F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* **60**, 2299-2301.

Kates, M. (1964) Bacterial Lipids. *Advances in Lipid Research* **2**, 17-90.

Kim, B.-Y., Weon, H. Y., Cousin, S., Yoo, S.-H., Kwon, S.-W., Go, S. J. & Stackebrandt, E. (2006) *Flavobacterium daejeonense* sp. nov. and *Flavobacterium suncheonense* sp. nov., isolated from greenhouse soil in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1635-1638.

Kohring, L. L., Ringelberg, D. B., Devereux, R., Stahl, D. A., Mittelman, M. W. & White, D. C. (1994) Comparison of phylogenetic relationships based on phospholipid fatty acid

profiles and ribosomal RNA sequence similarities among dissimilatory sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**, 303-308.

Konstantinidis, K. T. & Tiedje, J. M. (2005) Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 2567-2572.

Koskinen, O. M., Husman, T. M., Meklin, T. M. & Nevalainen, A. I. (1999). The relationship between moisture or mould observations in houses and the state of health of their occupants. *Eur Respir J* **14**, 1363-1367.

Kroppenstedt, R. M. (1979) Chromatographische Identifizierung von Mikroorganismen, dargestellt am Beispiel der Actinomyceten. *Kontakte* **2**, 12-21.

Krishnamurthy, T., Ross, P. L. & Rajamani, U. (1996) Detection of pathogenic and non-pathogenic bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 883-888.

Küntzel, H. (1969) Proteins of mitochondrial and cytoplasmic ribosomes from *Neurospora crassa*. *Nature* **222**, 142-146.

Lambert, M. A. & Moss, C. W. (1983) Comparison of the effects of acid and basehydrolyses on hydroxy and cyclopropane fatty acids in bacteria. *J. Clin. Micro.* **18**, 1370-1377.

Lasch, P., Nattermann, H., Erhard, M., Stämmeler, M., Grunow, R., Bannert, N., Appel, B. & Naumann, D. (2008) MALDI-TOF mass spectrometry compatible inactivation method for highly pathogenic microbial cells and spores. *Anal. Chem.* **80**, 2026-2034.

Lechevalier, M. P. & Lechevalier, H. A. (1970) Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int J Syst Bacteriol.* **20**, 435-443.

Lee, D.-H., Zu, Y.-G. & Kim, S.-J. (1996). Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single strand conformation polymorphism. *Appl Environ Microbiol.* **62**, 3112-3120.

Liu, H., Du, Z., Wang, J. & Yang, R. (2007) Universal sample preparation method for characterization of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1899-1907.

Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H. & Forney, L. J. (1997) Characterisation of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4516-4522.

Lorenz, W., Trautmann, C. & Dill, I. (2003) Nachweis und Bedeutung von Actinomyceten und sonstigen Bakterien in Innenräumen. Handbuch für Bioklima (Hrsg. Moriske, Turowski), Kap. III-4.4.14 ecomed Verlag, Landsberg am Lech, 10. Erg. Lfg, 12.

Lorenz, W., Trautmann, C., Kroppenstedt, R. M., Sigrist, G., Stackebrandt, E., Gareis, M., Dill, I. & Virnich, L. (2002). Actinomycetes in mouldy houses, the causative agent of rheumatoid symptoms? Proceedings of the 9th International Conference on Indoor Air Quality and Climate - Indoor Air 02, Monterey: Indoor Air.

Ludwig, W. & Klenk, H.-P. (2001) Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, 49-65. Edited by Boone, D. R., Castenholz, R. W. & Garrity, G. M., New York: Springer.

Madigan, M. T. (2001) Grampositive filamentöse Bakterien mit hohem GC-Gehalt: die Actinomyceten. In *Mikrobiologie*, 9. Auflage. Eds., Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. 577-582. Spektrum, Berlin.

Magnet Lab (2009) Tools of the Trade; Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI). National High Magnetic Field Laboratory; FSU: http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/ionization_maldi.html

Majcherczyk, P. A., McKenna, T., Moreillon, P. & Vaudaux, P. (2006) The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **255**, 233-239.

- Mandrell, R. E., Harden, L. A., Bates, A., Miller, W. G., Haddon, W. F. & Fagerquist, C. K. (2005)** Speciation of *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, *C. helveticus*, *C. lari*, *C. sputorum*, and *C. upsaliensis* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 6292–6307.
- Marklein, G., Josten, M., Klanke, U., Müller, E., Horré, R., Maier, T., Wenzel, T., Kostrzewa, M., Bierbaum, G., Hoerauf, A. & Sahl, H. G. (2009)** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 2912-2917.
- Martin, K., Schäfer, J. & Kämpfer, P. (2010)** *Promicromonospora umidemergens* sp. nov., isolated from moisture from indoor wall material. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 537–541.
- Massol-Deya, A. A., Odelson, D. A., Hickey, R. F. & Tiedje, J. M. (1995)** Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal RNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In: Akkermans, A. D. L., Van Elsas, J. D. & De Bruijn, F. J. (Eds.), *Molecular Microbial Ecology Manual*, vol. 3.3.2. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 1-8.
- Mazzeo, M. F., Sorrentino, A., Gaita, M., Cacace, G., Di Stasio, M., Facchiano, A., Comi, G., Malorni, A. & Siciliano, R. A. (2006)** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the discrimination of food-borne microorganisms, *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 1180–1189.
- McCammon, S. A. & Bowman, J. P. (2000)** Taxonomy of *Antarctic Flavobacterium* species: description of *Flavobacterium gillisiae* sp. nov., *Flavobacterium tegetincola* sp. nov. and *Flavobacterium xanthum* sp. nov., nom. rev. and reclassification of [*Flavobacterium*] *salegens* as *Salegentibacter salegens* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 1055-1063.
- Medzihradszky, K. F., Campbell, J. M., Baldwin, M. A., Falick, A. M., Juhasz, P., Vestal, M. L. & Burlingame, A. L. (2000)** The Characteristics of Peptide Collision-Induced Dissociation Using a High-Performance MALDI TOF/TOF Tandem Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* **72**, 552-558.

Mumy, K. L. & Findlay, R. H. (2004) Convenient determination of DNA extraction efficiency using an external DNA recovery standard and quantitative-competitive PCR. *J Microbiol Meth* **57**, 259-268.

Muurholm, S., Cousin, S., Päucker, O., Brambilla, E. & Stackebrandt, E. (2007) *Pedobacter duraquae* sp. nov., *Pedobacter westerhofensis* sp. nov., *Pedobacter metabolipauper* sp. nov., *Pedobacter hartonius* sp. nov. and *Pedobacter steynii* sp. nov., isolated from a hard-water rivulet. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2221-2227.

Muyzer, G., de Waal, E. C. & Uitterlinden, A. G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 695-700.

Muyzer, G., Hottenträger, S., Teske, A. & Wawer, C. (1996) Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA. a new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In: Akkermans, A. D. L., Van Elsas, J. D. & De Bruijn, F. J. (Eds.), *Molecular Microbial Ecology Manual*, manual 3.4.4. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands.

Muyzer, G. & Smalla, K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**, 127-41.

Myers, R. M., Fischer, S. G., Lerman, L. S. & Maniatis, T. (1985) Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* **13**, 3131-3145.

Nilsson, C. L. (1999) Fingerprinting of *Helicobacter pylori* strains by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **13**, 1067–1071.

Nogi, Y., Soda, K. & Oikawa, T. (2005) *Flavobacterium frigidimaris* sp. nov., isolated from Antarctic seawater. *Syst Appl Microbiol* **28**, 310–315.

Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R. I., Ludwig, W. & Backhaus, H. (1996) Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol* **178**, 5636-5643.

Nunes, O. C., Donato, M. M., Manaia, C. M. & Dacosta, M. S. (1992) The polarlipid and fatty acid composition of *Rhodothermus* strains. *Syst Appl microbiol* **15**, 59-62.

Ochoa, M. L. & Harrington, P. B. (2005) Immunomagnetic Isolation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 from Ground Beef and Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry and Database Searches. *Anal Chem* **77**, 5258-5267.

Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N. R. & Stahl, D. A. (1986) Microbial ecology and evolution: A ribosomal-RNA approach. *Ann Rev Microbiol.* **40**, 337-365.

Osborn, A. M., Moore, E. R. B., & Timmis, K. N. (2000) An evaluation of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* **2**, 39-50.

O'Sullivan, L. A., Rinna, J., Humphreys, G., Weightman, A. J. & Fry, J. C. (2006) Culturable phylogenetic diversity of the phylum 'Bacteroidetes' from river epilithon and coastal water and description of novel members of the family *Flavobacteriaceae*: *Epilithonimonas tenax* gen. nov., sp. nov. and *Persicivirga xylanidelens* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 169-180.

Pace, N. R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science.* **276**, 734-740.

Pace, N. R. (2009) Mapping the Tree of Life: Progress and Prospects. *Microbiol mol Biol* **73**, 565-576.

Pardue, M. L. & Gall, J. G. (1969) Molecular hybridization of radioactive DNA to DNA of cytological preparations. *Proc. US Nat. Acad. Sci.* **64**, 600-604.

Peltola, J. (2001) Microbial growth in building materials and toxigenic microbes in indoor environment, Dissertation Universität Helsinki.

Picard, C. H., Ponsonnet, C., Paget, E., Nesme, X. & Simonet P. (1992) Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and Polymerase Chain Reaction. *Appl Environ Microbiol* **58**, 2717-2722.

Pickup, R. (1991) Detection and study of microorganisms in the environment – new approaches. *8*, 499–503.

Pierce, C. Y., Barr, J. R., Woolfitt, A. R., Moura, H., Shaw, E. I., Thompson, H. A., Massung, R. F. & Fernandez, F. M. (2007) Strain and phase identification of the U.S. category B agent *Coxiella burnetii* by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and multivariate pattern recognition, *Anal. Chim. Acta* **583**, 23-31.

Pignone, M., Greth, K. M., Cooper, J., Emerson, D. & Tang, J. (2006) Identification of mycobacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 1963-1970.

Pribil, P. A. & Fenselau, C. (2005) Characterization of *Enterobacteria* using MALDI-TOF mass spectrometry, *Anal. Chem.* **77**, 6092–6095.

Pribil, P. A., Patton, E., Black, G., Doroshenko, V. & Fenselau, C. (2005) Rapid characterization of *Bacillus* spores targeting species-unique peptides produced with an atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization source. *J. Mass Spectrom.* **40**, 464-474.

Pridham, T. G., Hesseltine, C. W. & Benedict, R. G. (1958) A guide for the classification of *Streptomyces* according to selected groups: Placement of strains in morphological sections. *Appl. Microbiol.* **6**, 52-79.

Puder, C. (1998) Neue Streptazoline und Rubiginone aus Streptomyceten durch Variation der Kultivierungsbedingungen sowie Untersuchungen zur Struktur und Biosynthese der Rubromycine. Dissertation Universität Göttingen.

Rintala, H., Pitkäranta, M., Toivola, M., Paulin, L. & Nevalainen, A. (2008) Diversity and seasonal dynamics of bacterial community in indoor environment. *BMC Microbiol* **8**, 56.

Robert Koch-Institut, Bericht (2011) Abschließende Darstellung und Bewertung der epidemiologischen Erkenntnisse im EHEC O104:H4 Ausbruch, Deutschland 2011. Berlin.

Roponen, M., Toivola, M., Meklin, T., Ruotsalainen, M., Komulainen, H., Nevalainen, A. & Hirvonen, M.-R. (2001) Differences in Inflammatory Responses and Cytotoxicity in RWA 264.7 Macrophages induced by *Streptomyces anulatus* Grown on different Building Materials. *Indoor Air* **11**, 179-184.

Rosenbaum, V. & Riesner, D. (1987) Temperature-gradient gel electrophoresis; thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts. *Biophys Chem* **26**, 235-246.

Rossello-Mora, R. & Amann, R. (2001) The species concept for prokaryotes. *Fems Microbiology Reviews* **25**, 39-67.

Rölleke, S., Muyzer, G., Wawer, C., Wanner, G. & Lubitz, W. (1996) Identification of bacterial in a biodegraded wall painting by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2059-2065.

Ruelle, V., Moualij, B., Zorzi, W., Ledent, P., & De Pauw, E. (2004) Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 2013-2019.

Rhuland, L. E., Work, E., Denman, R. F. & Hoare, D. S. (1955) The behaviour of the isomers of alpha, epsilon-diaminopimelic acid on paper chromatograms. *J Am Chem Soc* **77**, 4844-4846.

Saenz, A. J., Petersen, C. E., Valentine, N. B., Gantt, S. L., Jarman, K. H., Kingsley, M. T. & Wahl, K. L. (1999) Reproducibility of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for replicate bacterial culture analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* **13**, 1580-1585.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H. Stoffel, S. Scharf, S. J. Higuchi, R. Horn, G. T. Mullis, K. B. & Ehrlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* **74**, 5463-5467.

Sasser, M. (1990) Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. *Sherlock Microbial Identification System References*.

Schaal, K. P. (1970). Die Resistenz der Erreger der Aktinomykosen- klassische Aktinomykose und Nocardiose – gegen Umwelteinflüsse. III. Die Resistenz gegen Austrocknung. *Zentralbl Bakteriol, I Abt Orig* **215**, 483-497.

Schäfer, J., Busse, H.-J. & Kämpfer, P. (2009) *Pseudonocardia parietis* sp. nov., from the indoor environment. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 2449-2452.

Schäfer, J., Jäckel, W. & Kämpfer, P. (2010a) Analysis of *Actinobacteria* from mould-colonized water damaged buildingmaterial. *Syst Appl microbiol* **33**, 260-268.

Schäfer, J., Martin, K. & Kämpfer, P. (2010b). *Citricoccus parietis* sp. nov., isolated from a mould-colonized wall, and emended description of *Citricoccus alkalitolerans*. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 271–274.

Schäfer, J., Martin, K. & Kämpfer, P. (2010c) *Prauserella muralis* sp. nov., from an indoor environment. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 287–290.

Schäfer, J., Kämpfer, P. & Jäckel, U. (2010d) Development of a new PCR primer system for selective amplification of *Actinobacteria*. *FEMS Microbiol Lett* **311**,103-112.

Schmalenberger, A. & Tebbe, C. (2002) Bacterial community composition in the rhizosphere of a transgenic, herbicide-resistant maize (*Zea mays*) and comparison to its non-transgenic cultivar Bosphore. *FEMS Microbiology Ecology* **40**, 29-37.

Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P. E., Rolain, J. M. & Raoult, D. (2009) Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* **49**, 543-551.

Sheffield, V. C., Cox, D. R., Lerman, L. S. & Myers, R. M. (1989) Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 232-236.

Sherburn, R. E. & Jenkins, R. O. (2003) A novel and rapid approach to yeast differentiation using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Spectroscopy* **17**, 31-38.

Sherman, F., Stewart, J. W. & Tsunasawa, S. (1985) Methionine or not methionine at the beginning of a protein. *BioEssays* **3**, 27-31.

Shetty, N., Hill, G. & Ridgway, G. L. (1998) The Vitek analyser for routine bacterial identification and susceptibility testing: protocols, problems and pitfalls. *J clin Pathol* **51**, 316-323.

Shirling, E. B. & Gottlieb, D. (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**, 313–340.

Siegrist, T. J., Anderson, P. D., Huen, W. H., Kleinheinz, G. T., McDermott, C. M. & Sandrin, T. R. (2007) Discrimination and characterization of environmental strains of *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *J. Microbiol. Methods* **68**, 554–562.

Sigler, W. V., Miniaci, C. & Zeyer, J. (2004) Electrophoresis time impacts the denaturing gradient gel electrophoresis-based assessment of bacterial community structure. *J microbiol methods* **57**, 17-22.

Simpson, J. M., McCracken, V. J., White, B. A., Gaskins, H. R. & Mackie, R. I. (1999) Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *J. Microbiol. Methods* **36**, 167–179.

Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., Roskot, N., Heuer, H. & Berg, G. (2001) Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4742-4751.

Sneath, P. H. A. (1992) International Code of Nomenclature of Bacteria: Bacteriological Code, 1990. ASM Press.

Sorokin, D. Y., van Pelt, S., Tourova, T. P., & Evtushenko, L. I. (2009) *Nitriliruptor alkaliphilus* gen. nov., sp. nov., a deep-lineage haloalkaliphilic actinobacterium from soda lakes capable of growth on aliphatic nitriles, and proposal of *Nitriliruptoraceae* fam. nov. and *Nitriliruptorales* ord. nov. *Int J Syst Evol Microbio* **59**, 248-253.

Spengler, J., Neas, L., Nakai, S., Dockery, D., Speizer, F., Ware, J. & Raizenne, M. (1994) Respiratory symptoms and housing characteristics. *Indoor Air* **4**, 72-82.

Stackebrandt, E. (1992) Unifying phylogeny and phenotypic properties, 19-47. In: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer, K. H. (eds). *The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, 2nd edn. New York: Springer.

Stackebrandt, E. & Ebers, J. (2006) Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol. Today* **33**, 152-155.

Stackebrandt, E., Frühling, F., Cousin, S., Brambilla, E., Lünsdorf, H. & Verbarg, S. (2008) *Methylibium subsaxonicum* spec. nov., a betaproteobacterium isolated from a hardwater rivulet. *Curr Microbiol* **56**, 298–305.

Stackebrandt, E. & Göbel, B. M. (1994) Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 846-849.

Stackebrandt, E., Lang, E., Cousin, S., Päuker, O., Brambilla, E., Kroppenstedt, R. & Lünsdorf, H. (2007) *Deefgea rivuli* gen. nov., sp. nov., a member of the class Betaproteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 639-645.

Stackebrandt, E., Päuker, O. & Erhard M. (2005) Grouping *Myxococci* (*Corallococcus*) strains by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI TOF) mass spectrometry: comparison with gene sequence phylogenies. *Curr Microbiol* **50**, 71-77.

Stackebrandt, E., Rainey, F. & Ward-Rainey, N., (1997) Proposal for a new hierarchical classification system *Actinobacteria* classis nov. . *Int J Syst Bacteriol* **47**, 479-491.

Suihko, M. L., Priha, O., Alakomi, H. L., Thompson, P., Mälarstig, B., Stott, R. & Richardson, M. (2009) Detection and molecular characterization of filamentous *Actinobacteria* and thermoactinomycetes present in water-damaged building materials. *Indoor Air* **19**, 268-277.

Sun, L., Teramoto, K., Sato, H., Torimura, M., Tao, H. & Shintani, T. (2006) Characterization of ribosomal proteins as biomarkers for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectral identification of *Lactobacillus plantarum*. *Rapid Commun. Mass Spectrom* **20**, 3789-3798.

Sundell, J., Lindvall, T., Stenberg, B. & Wall, S. (1994) Sick Building Syndrome (SBS) in office workers and facial skin symptoms among VDT-workers in relation to building and room characteristics: Two case-referent studies. *Indoor Air* **4**, 83-94.

Sužiedėlienė, E, Sužiedėlis, K, Garbenciūtė, V. & Normark, S. (1999). The acid-inducible *asr* gene in *Escherichia coli*: transcriptional control by the *phoBR* operon. *J Bacteriol* **181**, 2084-2093.

Svensson, L. A., Gomila, M., Mihaylova, S. A., Erhard, M. & Moore, E. (2010) New genotypic and phenotypic analyses of clinically-relevant Gram-negative, non-fermenting bacteria: MALDI-TOF MS as a rapid, high-resolution method for identifying and typing microorganisms. *In: 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)*, Vienna, Austria.

Szewzyk, R. (2008) Gesundheitsgefährdung durch Schimmelpilze? *Gef Reinhalt Luft* **68**, 345.

Szewzyk, R. (2009) Schimmelpilze sind nicht die einzigen Übeltäter bei Feuchteschäden in Wohnungen. telegramm: umwelt + gesundheit, Umweltbundesamt (Hrgs.)

Taylor, J. P., Wilson, B., Mills, M. S., Burns, R. G. (2002) Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biol Biochem* **34**, 387-401.

Teramoto, K., Sato, H., Sun, L., Torimura, M. & Tao, H. (2007 a) A simple intact protein analysis by MALDI-MS for characterization of ribosomal proteins of two genome-sequenced lactic acid bacteria and verification of their amino acid sequences. *Proteome Res.* **6**, 3899-3907.

Teramoto K. Sato, H., Sun, L., Torimura, M., Tao, H., Yoshikawa, H., Hotta Y., Hosoda A. & Tamura, H. (2007b) Phylogenetic Classification of *Pseudomonas putida* Strains by MALDI-MS Using Ribosomal Subunit Proteins as Biomarkers. *Anal. Chem.* **79**, 8712-8719.

Tighe, S. W., Lajudie de, P., Dipietro, K., Lindstöm, K., Nick, G. & Jarvis, B. D. W. (2000) Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationships of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species using the Sherlock Microbial Identification System. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 787-801.

Toivola, M., Alm, S., Reponen, T., Kolari, S. & Nevalainen, A. (2002) Personal exposures and microenvironmental concentrations of particles and bioaerosols. *J Environ Monit* **4**, 166-174.

Valentine, N. B., Wahl, J. H., Kingsley, M. T. & Wahl, K. L. (2002) Direct surface analysis of fungal species by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, 1352-1357.

Valentine, N., Wunschel, S., Wunschel, D., Petersen, C. & Wahl, K. (2005) Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 58-64.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. & Swings, J. (1996) Polyphasic Taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews* **60**, 407-438.

Van Elsas, J. D., Duarte, G. E., Rosado, A. S. & Smalla, K. (1998) Microbiological and molecular methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the environment. *J. Microbiol. Methods* **32**, 133-54.

Van Hoorde, K., Vandamme, P. & Van Landschoot, A. (2010) Matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry (maldi-tof ms) of microbial mixtures: a first impression of its applicability for the analysis of gastrointestinal microbiota. 12th Gut Day Symposium September 23rd, 2010 Gent.

Vanlaere, E., Sergeant K., Dawyndt, P., Kallow, W., Erhard, M., Sutton, H., Dare, D., Devreese, B., Samyn, B. & Vandamme, P. (2008) Matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry of intact cells allows rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex. *J. Microbiol. Methods* **75**, 279-286.

Van Niel, C. B. (1944) The culture, general physiology, morphology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. *Bact Rev.* **8**, 1-118.

Van Trappen, S., Mergaert, J. & Swings, J. (2003) *Flavobacterium gelidilacus* sp. nov., isolated from microbial mats in Antarctic lakes. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1241-1245.

Van Trappen, S., Vandecandelaere, I., Mergaert, J. & Swings, J. (2004) *Flavobacterium degerlachei* sp. nov., *Flavobacterium frigoris* sp. nov., and *Flavobacterium micromati* sp. nov., novel psychrophilic bacteria isolated from microbial mats in Antarctic lakes. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 85-92.

Van Trappen, S., Vandecandelaere, I., Mergaert, J. & Swings, J. (2005) *Flavobacterium fryxellicola* sp. nov. and *Flavobacterium psychrolimnae* sp. nov., novel psychrophilic bacteria isolated from microbial mats in Antarctic lakes. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 769-772.

Van Veen, S. Q., Claas, E. C. & Kuijper, E. J. (2010) High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 900-907.

Vargha, M., Takats, Z., Konopka, A. & Nakatsu, C. H. (2006) Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of *Arthrobacter* isolates. *J. Microbiol. Methods* **66**, 399-409.

Verbarg, S., Frühling, A., Cousin, S., Brambilla, E., Gronow, S., Lünsdorf, H. & Stackebrandt, E. (2008) *Biostraticola tofi* gen. nov., spec. nov., a novel member of the family *Enterobacteriaceae*. *Curr Microbiol* **56**, 603–608.

Vlek, A. L. M., Bonten, M. J. M. & Boel, C. H. E. (2012) Direct Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Improves Appropriateness of Antibiotic Treatment of Bacteremia. *PLoS ONE* **7**, e32589. doi:10.1371/journal.pone.0032589.

Wahl, K. L., Wunschel, S. C., Jarman, K. H., Valentine, N. B., Petersen, C. E., Kingsley, M. T., Zartolas, K. A. & Saenz, A. J. (2002) Analysis of microbial mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **74**, 6191-6199.

- Walker, J., Fox, A. J., Edwards-Jones, V. & Gordon, D. B. (2002)** Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Media effects and interlaboratory reproducibility. *J. Microbiol. Methods* **48**, 117-126.
- Wang, Z.-W., Liu, Y.-H., Dai, X., Wang, B.-J., Jiang, C.-Y. & Liu, S.-J. (2006)** *Flavobacterium saliperosum* sp. nov., isolated from freshwater lake sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 439-442.
- Welker, M. (2011)** Proteomics for routine identification of microorganisms. *Proteomics* **11**, 3143-3153.
- Wenzel, T., Klepel, S., Maier, T., Wegmann, M. & Kostrzewa, M. (2010)** Automated detection of mixes cultures of microorganisms from positive blood cultures using MALDI-TOF mass spectrometry. VAAM-Jahrestagung 2010, Hannover.
- Wilkins, C. L. & Lay, J. O. (2006)** Identification of Microorganisms by Mass Spectrometry. John Wiley & Sons, Inc. United States of America, New Jersey.
- Wink, J. (2002)** Polyphasic taxonomy and antibiotic formation in some closely related genera of the family *Pseudonocardiaceae*. In Recent Research Developments in Antibiotics. Eds., S. G. PANDALAI, pp. 97-140. Transworld Research Network, Kerala India.
- Winkelmann, N., Jaekel, U., Meyer, C., Serrano, W., Rachel, R., Rossello-Mora, R. & Harder, J., (2010)** Determination of the diversity of *Rhodopirellula* isolates from european seas by multilocus sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* **76**, 776-785.
- Woese, C. (1987)** Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-71.
- Woese, C. R. & Fox, G. E. (1977)** Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA.* **74**, 5088-5090.
- Yang, Y., Sreenivasan, P. K., Subramanyam, R. & Cummins, D. (2006)** Multiparameter assessments to determine the effects of sugars and antimicrobials on a polymicrobial oral biofilm. *Appl Environ Microbiol* **72**, 6734-6742.

Yi, H. & Chun, J. (2006) *Flavobacterium weaverense* sp. nov. and *Flavobacterium segetis* sp. nov., novel psychrophiles isolated from the Antarctic. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1239-1244.

Yoon, J.-H., Kang, S.-J. & Oh, T.-K. (2006) *Flavobacterium soli* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 997-1000.

Zarda, B., Hahn, D., Chatzinotas, A., Schönhuber, W., Neef, A., Amann, R. I. & Zeyer, R. (1997) Analysis of bacterial community structure in bulk soil by in situ hybridization. *Arch. Microbiol.* **168**, 185-192.

Zhang, Y., Shen, J., Wang, J.-J. & Zhang, S.-Z. (2011) Phylogenetic diversity and spatial heterogeneity of *Actinobacteria* communities in the surface sediments of the East Taihu Lake. *Ecological Science* **30**, 8-13.

Zhu, F., Wang, S. & Zhou, P. (2003) *Flavobacterium xinjiangense* sp. nov. and *Flavobacterium omnivorum* sp. nov., novel psychrophiles from the China No. 1 glacier. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 853-857.

6 Anhang

Flavobacterium Typstämme

<i>Flavobacterium antarcticum</i>	DSM 19726 ^T
<i>Flavobacterium aquatile</i>	DSM 1132 ^T
<i>Flavobacterium aquidurense</i>	DSM 18293 ^T
<i>Flavobacterium columnare</i>	DSM 18644 ^T
<i>Flavobacterium croceum</i>	DSM 17960 ^T
<i>Flavobacterium cucumis</i>	DSM 18830 ^T
<i>Flavobacterium daejeonense</i>	DSM 17708 ^T
<i>Flavobacterium defluvii</i>	DSM 17963 ^T
<i>Flavobacterium degerlachei</i>	DSM 15718 ^T
<i>Flavobacterium denitrificans</i>	DSM 15936 ^T
<i>Flavobacterium flevense</i>	DSM 1076 ^T
<i>Flavobacterium frigidarium</i>	DSM 17623 ^T
<i>Flavobacterium frigidimaris</i>	DSM 15937 ^T
<i>Flavobacterium frigoris</i>	DSM 15719 ^T
<i>Flavobacterium fryxellicola</i>	DSM 16209 ^T
<i>Flavobacterium gelidilacus</i>	DSM 15343 ^T
<i>Flavobacterium glaciei</i>	DSM 19728 ^T
<i>Flavobacterium granuli</i>	DSM 19729 ^T
<i>Flavobacterium hercynium</i>	DSM 18292 ^T
<i>Flavobacterium hibernum</i>	DSM 12611 ^T
<i>Flavobacterium hydatis</i>	DSM 2063 ^T
<i>Flavobacterium indicum</i>	DSM 17447 ^T
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	DSM 2064 ^T
<i>Flavobacterium limicola</i>	DSM 15094 ^T
<i>Flavobacterium micromati</i>	DSM 17659 ^T
<i>Flavobacterium omnivorum</i>	DSM 19742 ^T
<i>Flavobacterium pectinovorum</i>	DSM 6368 ^T
<i>Flavobacterium psychrolimnae</i>	DSM 16141 ^T
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	DSM 3660 ^T
<i>Flavobacterium saccharophilum</i>	DSM 1811 ^T
<i>Flavobacterium saliperosum</i>	JSM 13331 ^T
<i>Flavobacterium segetis</i>	DSM 19741 ^T
<i>Flavobacterium soli</i>	DSM 19725 ^T

<i>Flavobacterium succinicans</i>	DSM 4002 ^T
<i>Flavobacterium suncheonense</i>	DSM 17707 ^T
<i>Flavobacterium terrae</i>	DSM 18829 ^T
<i>Flavobacterium terrigena</i>	DSM 17934 ^T
<i>Flavobacterium weaverense</i>	DSM 19727 ^T
<i>Flavobacterium xanthum</i>	DSM 3661 ^T
<i>Flavobacterium xinjiangense</i>	DSM 19743 ^T
<i>Sphigomonas paucimobilis</i>	DSM 30198 ^T
<i>Novosphingobium resinovorum</i>	DSM 7478 ^T

Die in der Arbeit gemeesenen Gattungen in Aktinomyceten

Amycolatopsis

<i>Amycolatopsis balhimycina</i>	DSM 44591 ^T
<i>Amycolatopsis decaplanina</i>	DSM 44594 ^T
<i>Amycolatopsis echigonensis</i>	DSM 45164 ^T
<i>Amycolatopsis eurytherma</i>	DSM 44348 ^T
<i>Amycolatopsis fastidiosa</i>	DSM 43855 ^T
<i>Amycolatopsis halotolerans</i>	DSM 45041 ^T
<i>Amycolatopsis keratiniphila</i> ssp. <i>nogabecina</i>	DSM 44586 ^T
<i>Amycolatopsis lexingtonensis</i>	DSM 44653 ^T
<i>Amycolatopsis lurida</i>	DSM 43134 ^T
<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	DSM 43304 ^T
<i>Amycolatopsis methanolica</i>	DSM 44096 ^T
<i>Amycolatopsis niigatensis</i>	DSM 45165 ^T
<i>Amycolatopsis orientalis</i> ssp. <i>orientalis</i>	DSM 40040 ^T
<i>Amycolatopsis pretoriensis</i>	DSM 44654 ^T
<i>Amycolatopsis pretoriensis</i>	DSM 44654 ^T
<i>Amycolatopsis rubida</i>	DSM 44637 ^T
<i>Amycolatopsis sacchari</i>	DSM 44468 ^T
<i>Amycolatopsis sulphurea</i>	DSM 46092 ^T
<i>Amycolatopsis thermoflava</i>	DSM 44574 ^T
<i>Amycolatopsis tolypomycina</i>	DSM 44544 ^T
<i>Amycolatopsis ultimotia</i>	DSM 45180 ^T
<i>Amycolatopsis vancoresmycina</i>	DSM 44592 ^T

Citricoccus

<i>Citricoccus alkalitolerans</i>	DSM 15665 ^T
<i>Citricoccus muralis</i>	DSM 14442 ^T

Isoptericola

<i>Isoptericola halotolerans</i>	DSM 16376 ^T
<i>Isoptericola hypogeus</i>	DSM 16849 ^T
<i>Isoptericola variabilis</i>	DSM 10177 ^T

Jiangella

<i>Jiangella alba</i>	DSM 45237 ^T
<i>Jiangella alkaliphila</i>	DSM 45079 ^T
<i>Jiangella gansuensis</i>	DSM 44835 ^T
<i>Jiangella ginsengisoli</i>	DSM 45060 ^T

Kribbella

<i>Kribbella alba</i>	DSM 15500 ^T
<i>Kribbella aluminosa</i>	DSM 18824 ^T
<i>Kribbella antibiotica</i>	DSM 15501 ^T
<i>Kribbella catacumbae</i>	DSM 19601 ^T
<i>Kribbella flavida</i>	DSM 17836 ^T
<i>Kribbella hippodromi</i>	DSM 19227 ^T
<i>Kribbella jejuensis</i>	DSM 17305 ^T
<i>Kribbella karoonensis</i>	DSM 17344 ^T
<i>Kribbella koreensis</i>	DSM 17837 ^T
<i>Kribbella lupini</i>	DSM 16683 ^T
<i>Kribbella sancallistae</i>	DSM 19602 ^T
<i>Kribbella sandramycini</i>	DSM 15626 ^T
<i>Kribbella solani</i>	DSM 17294 ^T
<i>Kribbella swartbergensis</i>	DSM 17345 ^T
<i>Kribbella yunnanensis</i>	DSM 15499 ^T

Nocardiopsis

<i>Nocardiopsis aegyptia</i>	DSM 44442 ^T
<i>Nocardiopsis alba</i>	DSM 43377 ^T
<i>Nocardiopsis alkaliphila</i>	DSM 44657 ^T
<i>Nocardiopsis arabia</i>	DSM 45083 ^T
<i>Nocardiopsis arvandia</i>	DSM 45278 ^T
<i>Nocardiopsis baichengensis</i>	DSM 44845 ^T
<i>Nocardiopsis benisuefensis</i>	DSM 44686 ^T
<i>Nocardiopsis chromatogenes</i>	DSM 44844 ^T
<i>Nocardiopsis composta</i>	DSM 44551 ^T
<i>Nocardiopsis dassonvillei albirubida</i>	DSM 40465 ^T
<i>Nocardiopsis dassonvillei ssp. dassonvillei</i>	DSM 43111 ^T
<i>Nocardiopsis exhalans</i>	DSM 44407 ^T
<i>Nocardiopsis falvida</i>	DSM 45312 ^T
<i>Nocardiopsis gangjiahuensis</i>	DSM 45031 ^T
<i>Nocardiopsis gilva</i>	DSM 44841 ^T

<i>Nocardiopsis halophila</i>	DSM 44494 ^T
<i>Nocardiopsis halotolerans</i>	DSM 44410 ^T
<i>Nocardiopsis kunsanensis</i>	DSM 44524 ^T
<i>Nocardiopsis listeri</i>	DSM 40297 ^T
<i>Nocardiopsis litoralis</i>	DSM 45168 ^T
<i>Nocardiopsis lucentensis</i>	DSM 44048 ^T
<i>Nocardiopsis metallicus</i>	DSM 44598 ^T
<i>Nocardiopsis potens</i>	DSM 45234 ^T
<i>Nocardiopsis prasina</i>	DSM 43845 ^T
<i>Nocardiopsis quinghaiensis</i>	DSM 44739 ^T
<i>Nocardiopsis rhodophaea</i>	DSM 44843 ^T
<i>Nocardiopsis rosea</i>	DSM 44842 ^T
<i>Nocardiopsis salina</i>	DSM 44839 ^T
<i>Nocardiopsis sinuspersici</i>	DSM 45277 ^T
<i>Nocardiopsis synnemataformans</i>	DSM 44143 ^T
<i>Nocardiopsis trehalosi</i>	DSM 44380 ^T
<i>Nocardiopsis tropica</i>	DSM 44381 ^T
<i>Nocardiopsis umidischolae</i>	DSM 44362 ^T
<i>Nocardiopsis valliformis</i>	DSM 45023 ^T
<i>Nocardiopsis exhalans</i>	DSM 44645
<i>Nocardiopsis exhalans</i>	DSM 44646
<i>Nocardiopsis umidischolae</i>	DSM 44647

Ornithinicoccus

<i>Ornithinicoccus hortensis</i>	DSM 12335 ^T
<i>ornithinicoccus hortensis</i>	DSM 12336

Promicromonospora

<i>Promicromonospora aerolata</i>	DSM 15943 ^T
<i>Promicromonospora citrea</i>	DSM 43110 ^T
<i>Promicromonospora citrea</i>	DSM 43875
<i>Promicromonospora citrea</i>	DSM 43876
<i>Promicromonospora citrea</i>	DSM 43877
<i>Promicromonospora citrea</i>	DSM 46033
<i>Promicromonospora citrea</i>	DSM 46081
<i>Promicromonospora citrea</i>	DSM 46082
<i>Promicromonospora citrea</i>	DSM 46089
<i>Promicromonospora flava</i>	DSM 21481 ^T
<i>Promicromonospora kroppenstedtii</i>	DSM 19349 ^T
<i>Promicromonospora sukumoe</i>	DSM 44121 ^T
<i>Promicromonospora vindobonensis</i>	DSM 15942 ^T

Pseudonocardia

<i>Pseudonocardia acacia</i>	DSM 45401 ^T
<i>Pseudonocardia ailaonensis</i>	DSM 44979 ^T
<i>Pseudonocardia alaniniphila</i>	DSM 44660 ^T
<i>Pseudonocardia alni</i>	DSM 44104 ^T
<i>Pseudonocardia ammonioxydans</i>	DSM 44958 ^T
<i>Pseudonocardia antarctica</i>	DSM 44749 ^T
<i>Pseudonocardia autotrophica</i>	DSM 535 ^T
<i>Pseudonocardia carboxydivorans</i>	DSM 45349 ^T
<i>Pseudonocardia chloroethenivorans</i>	DSM 44698 ^T
<i>Pseudonocardia compacta</i>	DSM 43592 ^T
<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i>	DSM 44775 ^T
<i>Pseudonocardia endophytica</i>	DSM 44969 ^T
<i>Pseudonocardia halophobica</i>	DSM 43089 ^T
<i>Pseudonocardia hydrocarbonoxydans</i>	DSM 43281 ^T
<i>Pseudonocardia kongjuensis</i>	DSM 44525 ^T
<i>Pseudonocardia oroxyli</i>	DSM 44984 ^T
<i>Pseudonocardia parietis</i>	DSM 45256 ^T
<i>Pseudonocardia petroleophila</i>	DSM 43193 ^T
<i>Pseudonocardia sulfidoxydans</i>	DSM 44248 ^T
<i>Pseudonocardia tetrahydrofuranooxydans</i>	DSM 44239 ^T
<i>Pseudonocardia thermophila</i>	DSM 43832 ^T
<i>Pseudonocardia xinjiangensis</i>	DSM 44661 ^T
<i>Pseudonocardia yunnanensis</i>	DSM 44253 ^T
<i>Pseudonocardia zijingensis</i>	DSM 44774 ^T
<i>Pseudonocardia</i> sp.	DSM 44643 ^T

Saccharopolyspora

<i>Saccharopolyspora antimicrobia</i>	DSM 45119 ^T
<i>Saccharopolyspora cebuensis</i>	DSM 45019 ^T
<i>Saccharopolyspora emeiensis</i>	DSM 45122 ^T
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	DSM 40517 ^T
<i>Saccharopolyspora flava</i>	DSM 44771 ^T
<i>Saccharopolyspora halophila</i>	DSM 45007 ^T
<i>Saccharopolyspora hirsuta</i> ssp. <i>hirsuta</i>	DSM 43463 ^T
<i>Saccharopolyspora hirsuta</i> ssp. <i>kobensis</i>	DSM 44795 ^T
<i>Saccharopolyspora hordei</i>	DSM 44065 ^T
<i>Saccharopolyspora qijiaojiangensis</i>	DSM 45088 ^T
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	DSM 43747 ^T
<i>Saccharopolyspora rosea</i>	DSM 45226 ^T
<i>Saccharopolyspora shandongensis</i>	DSM 45244 ^T
<i>Saccharopolyspora spinosa</i>	DSM 44228 ^T
<i>Saccharopolyspora taberi</i>	DSM 43856 ^T

<i>Saccharopolyspora thermophila</i>	DSM 44575 ^T
<i>Saccharopolyspora tripterygii</i>	DSM 45269 ^T

Nocardia

<i>Nocardia carnea</i>	DSM 44582
<i>Nocardia carnea</i>	DSM 44644

Sequenzen von Isolaten**jy311_3**

TGAGCTTGATCCTGGCTCAGGCCGAACGCTGGTGGCGTGCTtAaCaCatGCAaGTCGAACGGtgAAGCT
CAGCTTGCTGGGTGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCCCTACTTCGG
GATAAGCCTTGAAACGAGGTCTAATACCGGATATGAACACTTGCTGCATGGTGGGTGTTGGAAAGT
TTTTCGGTGGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGTCG
ACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCACGTGAGGGAT
GACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTACGACAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAG
AAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTAT
TGGGCGTAAAGA

jy311-15

TGAGCTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTGAA
GCCAAGCTTGCTTGGTGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTGGACTC
TGGGATAAGCGCTGGAAACGGCGTCTAATACTGGATATGAGACGTGATCGCATGGTTCGTGTTTGAA
AGATTTTTCGGTCTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGC
GTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAG
GGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAG
AAAAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAA
TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTGCTGTGAAATCCCGAGGCTCAACCTCG
GGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTG
GAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGGCCGTAACCTGACGCTGA
GGAGCGAAAGGTGGGGAGCAAACAGGCTTAGATACCCTGGTAGTCCACCCCGTAAACGTTGGGAA
CTAGTTGTGGGGACCATTCCACGGTTTCCGTGACGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAG
TACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGA
TTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACGAGAACGGGCCAGAAATGGTC
AACTCTTTGGACACTCGTAAACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTATGTTGCCaGCACCGTAATGGTGGGAACCTCATGGGAT
ACTGTCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGgGGATGACGTCTAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCT
TCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCAATACCGTTAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAG
CCGGTCCCAGTTTCGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCGGAGTCCCTAGTAATCGCAGA
TCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTA

jy311-17

TTGAGCTTGATCCTGGCTCAGGCCGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGA
ACCTCTTCGAGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGG
GACAAGCCCTGGAACGGGGTCTAATACCGGATATGACGTGCGACCGCATGGTCTGTACGTGGAAA
GCTCCGGGGTGACAGGATGAGCCCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGC
GACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAG
GGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTACGACAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACcTGCAG
AAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCaGCaGCCGCGGTAATaCGTAGGGTGCGAGCGTtGTCCGGAATT
ATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTGCGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGG
GTCTGCATTTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAA
ATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGG
AGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAACT

AGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTA
CGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTT
AATTCGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGC
CCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCTTTTCGGGGTGATGGGGACTCAC
AGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGAGcTACGATCAAGTCATCATGCCCCTTATGTC
TTGGGCTGCACACGTGCTACGATGGTTCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTC
ACAAAGTCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAAT
CGCAGATCAGCATCGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTATAT

jy311-18

TGAGCTTGATCCTGGCTCAGGCCGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAA
CCTCTTCGGAGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGG
ACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACGTGCGACCGCATGGTCTGTACGTGGAAAG
CTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCG
ACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGaCGCCGCGTGAGG
gATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCaGCAGGGAAGAAGCGAAAGTgAcGGtACcTGcAGAAG
AAGCaCCGGCTAACTACGTGCCaGCaGCCGCGGTAAaCGTAgGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGAGCTCGTACGCGGCTTGTACGTTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCT
GCATTTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGC
GCAGATATCATGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCG
AAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAgTCCACGCCGTAAACGTTGGGAAGTAGGT
GTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGC
CGCAAGGCTAAAACTCAAAGaGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTC
GACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCAGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCC
TTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCC
CgCaAcGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCTTTTCGGGGTGATGGGGACTCACAGGAG
ACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGG
CTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAA
AGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCA
GATCAGCATCGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTA

jy311_21

TTGAGCTTGATCCTGGCTCAGGCCGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGA
ACCTCTTCGGAGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGG
GACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACGTGCGACCGCATGGTCTGTACGTGGAAA
GCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGC
GACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAG
GGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAG
AAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCaGCaGCCGCGGTAAaCGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATT
ATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGG
GTCTGCATTTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAA
ATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGG
AGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAaACGTTGGGAAGT
AGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTA
CGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTT
AATTcGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATACACCGgAAAGCCGTAGAGATACGGCC
CCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCTTTTCGGGGTGATGGGGACTCACA
GGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCT
TGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTC
AAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAAT
CGCAGATCAGCATCGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAA
AGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGGAATCGTCGAAGGTGGGACTG
GCGATTGGGACGAAGTCGTAAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTA

jy311_22

TGAGCTTGATCCTGGCTCAGGCCGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAG
GCCCTTTCGGGGGTACACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTGCCCTGCACTTCG
GGATAAGCCTGGGAAACCGGGTCTAATACCGGATATGAGCTCCTGCCGCATGGTGGGGGTGGAAAG
TTTTTCGGTGCAGGATGAGTCCGCGGCCTATCAGCTTGTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGAC
GACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGG
ATGACGGTCTTCGGATTGTAAACTCCTTTTCAGTAGGGACGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAA
GAAGCACCGGCCAACTACGTGCCaGCaGCCGCGGTAATaCGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGAATTAT
TGGGCGTAAAGA

jy311_23

TGAGCTTGATCCTGGCTCAGGCCGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAA
CCTCTTCGGAGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGG
ACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACGTGCGACCGCATGGTCTGTACGTGGAAAG
CTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCCGCGCCTATCAGCTTGTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCG
ACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAG
GGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAG
AAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCaGCaGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAAT
TATTGGGCGTAAAGA

jy311_24

TTGAGCTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGA
ACCTCTTCGGAGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGG
GACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACGTGCGACCGCATGGTCTGTACGTGGAAA
GCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCCGCGCCTATCAGCTTGTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGC
GACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGAaTGAGACACGGCCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAG
GGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAG
AAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCaGCaGCCGCGGTAATaCGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATT
ATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTGCGATGTGAAAGCCCCGGGGCTTAACCCCGG
GTCTGCATTTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAA
ATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGG
AGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAAC
AGGTGTGGGCGACATTCCACGTGCTCCGTGCCGACGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTA
CGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTT
AATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGC
CCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTGTTGCCAGCATGCCTTTCGGGGTGATGGGGACTCAC
AGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTC
TTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTC
AAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAAT
CGCAGATCAGCATCGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAA
AGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAATCGTCGAAGGTGGGACTG
GCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTA

FH7056

TTGAGCTTGATCCTGGCTCAGGCCGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGA
ACCTCTTCGGAGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGG
GACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACGTGCGACCGCATGGTCTGTACGTGGAAA
GCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCCGCGCCTATCAGCTTGTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGC
GACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAG
GGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAG
AAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCaGCaGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAAT
TATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTGCGATGTGAAAGCCCCGGGGCTTAACCCCG
GGTCTGCATTTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGA

AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAG
GAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAAC
TAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCTGGGGAGT
ACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTT
AATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGC
CCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTACGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCTTTCGGGGTGATGGGGACTCAC
AGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCaTGCCCTTATGTC
TTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTC
AAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAAT
CGCAGATCAGCATCGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAA
AGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAATCGTCGAAGGTGGGACTG
GCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTA

FH7057

TGAGCTTGATCCTGGCTCAGGCCGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAA
CCTCTTCGGAGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGG
ACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACGTGCGACCGCATGGTCTGTACGTGGAAAG
CTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCG
ACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAG
GGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAG
AAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCaGCaGCCGCGTAATaCGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATT
ATTGGGCGTAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGG
GTCTGCATTTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAA
ATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGG
AGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAACT
AGGTGTGGGCGACATTcCACGTCGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTA
CGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTT
AATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAaAGCCGTAGAGATACGGC
CCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTACGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCTTTCGGGGTGATGGGGACTCAC
AGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTC
TTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGcTGCGATACCGCGAGGTGGAGcGAATCTC
AAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAAT
CGCAGATCAGCATCGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAA
AGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAATCGTCGAAGGTGGGACTG
GCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTA

FH7060

TGAGCTTGATCCTGGCTCAGGCCGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAA
CCTCTTCGGAGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGG
ACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACGTGCGACCGCATGGTCTGTACGTGGAAAG
CTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCG
ACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAG
GGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAG
AAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCaGCaGCCGCGTAATaCGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATT
ATTGGGCGTAAGA

jun_1

TGaGCTTGATCCTGGCTCAGGCCGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAG
CCGCTTCGGTGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGG
GACAAGCCCTGGAACGGGGTCTAATACCGGATACGATACCGGGCCGCATGGTCTGGTGGTGGAAA
GCTCCGGGGTGACAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGTACTAGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGC
GACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAG
GGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCCTTCACGGGTGACGGTACCT

GCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCaGCaGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCG
GAATTATTGGGCGTAAAGA

jy312-2

TGAGCTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACTA
ACCGTTTCCTTCGGGAAATGGTTAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACTGCCTGC
AAGACTGGGATAACATTTCGGAACGAATGCTAATACCGGATACACAATTTCTCGCATGAGGGAATT
GGGAAAGGCGGAGCAATCTGCCGCTTGACAGATGGACCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA
CGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAG
CAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACAACCTAGG
AGAGTAACTGCTCTTAGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCaGCaGCCG
CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGA

jy312-5

TaGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGA
TGGGAGCTTGCTCCCGGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG
GGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCG
GGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCG
ACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTCTGAGACACGGTCCAGACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTG
AAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGT
TTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCaGCaGCCGCGGTAATACGAAGGGTG
CAAGCGTTAATCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCGCGTAGGTGGTTTGGTAAGATGGATGTGAAATC
CCCCGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCATAACTGCCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAATT
TCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACCACTGGAC
TGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGC
CGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCG
ACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGT
GGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCCGGAACCTTG
CAGAGATGCGAGGGTGCCCTTCGGGAATCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTG
GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTG
GGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGG
CCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAAATGGTTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTG
GAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAAGTCGGAA
TCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTACCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTC
ACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGGGGGACGGTTACCACGGAG
TGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCT
TTCTA

jy312-8

ATGATTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACATTTAGGAATCTGCCTAGTAGTGGGGGATAGCTCGGGGAA
ACTCGAATTAATACCGCATACGACCTACGGGTGAAAGGGGGCGCAAGCTCTTGCTATTAGATGAGCC
TAAATCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGGCCACCAAGGCGACGATCTGTAACCTGGTCTGAGAG
GATGATCAGTCACACCGGAACTGAGACACGGTCCGGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAAG
CACTTTAAGCAGGGAGGAGAGGCTAATGGTTAATACCCATTAGATTAGACGTTACCTGCAGAATAAG
CACCGGCTAACTCTGTGCCaGCaGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTATTGGG
CGTAAAGAGAGTGTAGGTGGCTCATTAAGTCACATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAAGTGC
TGTGATACTGGTGGTGCTAGAATATGTGAGAGGGAAGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCTTCCTGGCATAATATTGACACTGAGATTCGAAA
GCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTTG
GGGTCCTTGAGACTTTAGTGGCGCAGTTAACGCGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA
GGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCA
ACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATAGTGAAGATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGG
AATTCACATACAGTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCCTTTTCTTATTGCCAGCGGGTTAAGCCGGGAACCTTTAAGGATACTGCCAGTGA
CAAACCTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTG
CTACAATGGTAGGTACAGAGGGTTGCTACACAGCGATGTGATGCTAATCTCAAAAAGCCTATCGTAG

TCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGAATGCT
GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCTATTGCACCAGAA
GTAGGTAGCCTAACGAAAGAGGGCGCTTACCACGGTGTGGTTCGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACA
AGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTA

jy312-9

TGAGCTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAA
GCCCAGCTTGCTGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTAACCTCT
GGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATAGGAGCGCCACCGCATGGTGGGTGTTGGAA
AGATTTATCGGTTTTGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGC
GACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAG
GGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAG
AAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATaCGTAGGGTGCGAGCGTTATCCGGAAT
TATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTGTCTGTGAAAGTCCGGGGCTTAACCCCGG
ATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGG
AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTAACTGACGCTGAG
GAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCAC
TAGGTGTGGGGACCATTCACGGTTTTCCGCGCCGACGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGT
ACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGAT
TAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTTCTCGATCGCCGTAGAGATACGGT
TTCCCTTTGGGGCGGGTTCACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCCATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCATGGGA
GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGAGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCCTGG
GCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCCAAAA
AGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCA
GATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCAAGTCACGAAAGT
TGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTGTGGGGGGAGCCGTCAAGGTGGGACCAGCGATT
GGGACTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTA

jy312-10

TGAGCTTGATCCTGGCTCAGGCCGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAG
GCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCCAGGCTTTGGG
ATAACCCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATATGACCTCTGACCGCATGGTTGGTGGTGAAAGTT
TTTCGGCTTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTTGATGGCCTACCAAGGCGACGA
CGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATG
ACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGACGAAGCGTAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAA
GCGCCGGcCAACTACGTGCCaGCaGCCGCGGTAAAGACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGCTCGACCGTGAAAACCTTGGGGCTCAACCCCAAGCCT
GCGGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATG
CGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGC
GAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGG
TGTGGGGGGCCTCTCCGTTCCCTGTGCCGACGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACG
GCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAAT
TcGATGCaACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGGCCGCAAACTGTCAGAGATGGCAGGTCC
TTCGGGGGGCGGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTCGATGTTGCCAGCGCGTTATGGCGGGGACTCATCGAAGACTGCC
GGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCAC
GCATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGCTGCGATAACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGG
TCTCAGTTTCGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAG
CAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTAGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAA
CACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGAGGGAGCCGTCAAGGTGGGGCTGGCGATTGGGAC
GAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTA

jy312-17.1

TGAGCTTGATCCTGGCTCAGGCCGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAGTC
GATGAGGAGCTTGCTTCTCTGAGACTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCAT
AAGACTGGGATAACTACCGGAACGGTAGCTAATACCGGATAGGTTCTTCTCTCGCATGGGAGAGGA

AAGAAAGACGGAGCAATCTGTCACTTATGGATGGACCTGCGGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAC
GGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA
CGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGC
AACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGTCTCTTA
GAGTAACTGCTAAGAGAGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCaGCaGCCG
CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCAGGAATTATTGGGCGTAAAGA

jy313-18

TGAGCTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAA
GACCGTGCTTGACACGGTTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTATCACGTGAGTAACCTTCCCTTGACT
CTGGGATAAGCCCCGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATACGACCAGTCCTCGCATGGGGTGCTGGTG
AAAGATTTATCGGTCTTGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAG
GCGATGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTG
CGGGATGACGGCCTTTCGGGTTGTAAACCGCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGC
AGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCaGCaGCCGCGGTAATaCGTAGGGCGCGAGCGTTATCCGGA
ATTATTGGGCGTAAAGA

jy313-22

TGAGCTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAA
GACCGTGCTTGACACGGTTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTATCACGTGAGTAACCTTCCCTTGACT
CTGGGATAAGCCCCGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATACGACCAGTCCTCGCATGGGGTGCTGGTG
AAAGATTTATCGGTCTTGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAG
GCGATGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTG
CGGGATGACGGCCTTTCGGGTTGTAAACCGCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGC
AGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCaGCaGCCGCGGTAATaCGTAGGGCGCGAGCGTTATCCGGA
ATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTACGTCTGCTGTGAAAGCCCCGGGGCTCAACCCC
GGGTGTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGT
GAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTTACTGACGCTG
AGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGC
ACTAGGTGTGGGGGACATTCCACGTTTTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGA
GTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGG
ATTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGGACCGGACCGCTGCAGAGATGC
AGCTTCCCTTCGGGGTCGGTTCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGG
GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTATGTTGCCAGCACGTCATGGTGGGGACTCATGGG
AGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTG
GGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCtAAA
AGCCGGTCTCAGTTCGGATCGAAGTCTGCAACTCgACTTCGTGAAGTTGGAGTCGCTAGTAATCGCA
GATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCCGTCAAGTCACGAAAGT
GGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTGTGGGGGGGAGCCGTCGAAGGTGGGACTCGCGAT
TGGGACTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTA

Zusammenstellung der identifizierungsrelevanten Ergebnisse

Stamm_Nr.	Ident-medium	weich	schleimig	zäh	flach	konvex	glatt	wellig	gelappt	fädig	runzlig	hell	dunkel	Kolonie	MALDI
jy311_1	CASO		1			1			1			1		beige	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
jy311_3.1	CASO			1		1	1						1	gelb	<i>Promicromonospora vindobonensis</i>
jy311_3.2	CASO			1		1		1					1	gelb	<i>Promicromonospora vindobonensis</i>
jy311_5.1	CASO	1			1		1						1	orange	<i>Dietzia natronolimnaea</i>
jy311_5.2	CASO	1				1	1						1	rot	<i>Dietzia natronolimnaea</i>
jy311_10	BHI		1			1			1		1		1	weiß	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i>
jy311_15.1	AIA	1			1		1						1	weiß	<i>Microbacterium testaceum</i>
jy311_15.2	AIA	1			1		1						1	weiß	<i>Microbacterium testaceum</i>
jy311_21	G, FS			1	1		1						1	weiß	<i>Streptomyces violaceoruber</i>
jy311_22	G, FS	1			1		1						1	orange	<i>Dietzia natronolimnaea</i>
jy311_23	G, FS			1	1		1						1	weiß	<i>Streptomyces avidinii</i>
jy311_24	G, FS			1		1	1						1	weiß, gelb	<i>Streptomyces viridosporus</i>
jy311_25.1	CM, FS		1			1			1			1		weiß	<i>Bacillus vallismortis</i>
jy311_25.2	CM, FS	1			1				1		1		1	beige	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i>
jy311_26.2	CM, FS	1			1				1		1		1	beige	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i>
FH 7056	G, FS			1	1		1						1	gelb	<i>Streptomyces avidinii</i>
FH 7057	G, FS			1	1		1						1	gelb	<i>Streptomyces avidinii</i>
FH 7060	CM, FS			1	1			1					1	weiß	<i>Streptomyces avidinii</i>
jy312_1.1	CASO		1			1	1			1			1	beige	<i>Bacillus vallismortis</i>
jy312_1.2	CASO	1			1				1			1		weiß	<i>Bacillus mojavensis</i>

jy312_1.3	CASO	1			1				1			1		beige	<i>Bacillus vallismortis</i>
jy312_2.1	CASO	1			1		1					1		orange	<i>Paenibacillus mendelii</i>
jy312_2.3	CASO	1			1		1					1		weiß	<i>Paenibacillus mendelii</i>
jy312_3.1	BHI		1			1	1						1	weiß	<i>Bacillus mojavensis</i>
jy312_3.3	BHI	1			1				1			1		weiß, schwarz	<i>Bacillus subtilis</i>
jy312_5	AIA	1			1		1						1	weiß	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>
jy312_6	AIA, FS		1			1		1					1	weiß	<i>Bacillus vallismortis</i>
jy312_8	AIA, FS	1			1		1					1		weiß	<i>Moraxella osloensis</i>
jy312_9.1	AIA, FS	1				1	1						1	gelb	<i>Micrococcus luteus</i>
jy312_9.4	AIA, FS	1				1	1						1	hell gelb	<i>Micrococcus luteus</i>
jy312_10	CM, FS			1	1				1		1		1	orange, weiß	<i>Micromonospora</i>
jy312_11	CM, FS	1			1		1					1		weiß	<i>Paenibacillus mendelii</i>
jy312_12	G, FS		1			1			1				1	weiß	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
jy312_17.1	CM, FS	1			1		1					1		weiß	<i>Paenibacillus</i> sp.
jy313_15	AIA, FS	1			1		1					1		orange	<i>Nesterenkonia jeotgali</i>
jy313_18	AIA, FS	1			1		1					1		orange	<i>Nesterenkonia jeotgali</i>
jy313_19	AIA, FS	1			1		1					1		orange	<i>Nesterenkonia jeotgali</i>
jy313_22	CM, FS	1			1			1					1	orange	<i>Nesterenkonia</i> sp.
jy313_25	CM, FS	1				1		1					1	weiß	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i>

7 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Mentor PD Dr. Joachim Wink für die Möglichkeit dieser Dissertation, die hilfreichen Anregungen und die aufmunternden Diskussionen bedanken.

Ein großer Dank richtet sich an Prof. Dr. Jörg Overmann für die Übernahme des Korreferats, die gewährte Unterstützung und für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Ich möchte mich herzlich bedanken bei Prof. Dr. Erko Stackebrandt für das Überlassen des interessanten Themas, für die hervorragende Betreuung und die anregenden Diskussionen.

Mein weiterer Dank gilt Dr. Peter Schumann, in dessen Arbeitsgruppe die Arbeit angefertigt wurde. Ich möchte mich für die Hilfestellungen bei allen möglichen Ideen bedanken.

Vielen Dank auch an die ganze Arbeitsgruppe. Bei Dr. Silker Pandella, Dr. Johannes Sikorski, Dr. Jörn Petersen, Dr. Cathrin Spröer bedanke ich mich für die Hilfsbereitschaft und vielen aufmunternden Worte. Ganz besonderer Dank richtet sich an Ulrike Steiner für die Einführung in MALDI-TOF MS Messungen. Ein Dank geht an Evelyne Brambilla für die DNA-Extraktion aus Isolaten. Bei Anika Wasner, Bettina Sträubler, Birgit Grün und Nicole Mrotzek bedanke ich mich für die Hilfe bei vielen Methoden und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Bei allen Mitarbeitern an der DSMZ, besonders der Mikrobiologie Abteilung möchte ich mich für die Unterstützung in allen Phasen der Arbeit bedanken. Mein herzlicher Dank gilt PD Dr. Hans-Peter Klenk für die anregenden Diskussionen und die Hilfe bei der Publikation. Bei Dr. Susanne Verbag, Dr. Rüdiger Pukall, PD Dr. Sabine Gronow, Dr. Brian Tindall, Dr. Stefan Spring und Mathias von Jan bedanke ich mich für das stets offene Ohr bei mikrobiologischen Fragstellungen. Bei Anja Frühling, Helga Pomrenke, Marlen Jando und Gabriele Pötter bedanke ich mich für die vielseitige Hilfe im Labor und für das angenehme Arbeitsklima.

Ein mein allerherzlichster Dank geht an Dr. Cord Uphoff für die Hilfe bei der Isolation von Ribosomen. Dr. Mareike Jogler sei für die Hilfe bei DGGE gedankt. Des Weiteren danke ich Anja Meier und Dr. Manfred Nimtz (HZI) für die MALDI TOF/TOF MS Analyse. Dr. Martin Westermann der Universität Jena danke ich für die Herstellung der EM Fotos.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Elke Heine-Dobbernack, Wenjun Ma, Jakob Schneider und Jan Meier-Kolthoff für das mühevollen Korrekturlesen bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern und Schwiegereltern bedanken, für die liebevolle Pflege meiner Tochter, wodurch es mir überhaupt möglich war, Zeit für die Dissertation zu haben. Zuletzt danke ich meiner Familie für die Liebe und die allumfassende Unterstützung. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!